

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2001年12月20日 (20.12.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/96581 A1(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C12N 15/82, A01H 5/00, C12N 5/10

鳩町龍田北4丁目1-4 Nara (JP). 加藤 晃 (KATO, Kou) [JP/JP]; 〒619-0224 京都府相楽郡木津町兜台5丁目1-3 コンフォールかぶと台25-304 Kyoto (JP). 山田靖宙 (YAMADA, Yasuhiro) [JP/JP]; 〒563-0017 大阪府池田市伏尾台1丁目24-8 Osaka (JP). 仁平卓也 (NIHIRA, Takuya) [JP/JP]; 〒606-0845 京都府京都市左京区下鴨南茶ノ木町3-3 Kyoto (JP). 進藤卓也 (SHINDO, Takuya) [JP/JP]; 〒654-0055 兵庫県神戸市須磨区須磨浦通2丁目3-33-303 Hyogo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/05096

(22) 国際出願日: 2001年6月15日 (15.06.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2000-180466 2000年6月15日 (15.06.2000) JP

(74) 代理人: 安富康男, 外 (YASUTOMI, Yasuo et al.); 〒532-0011 大阪府大阪市淀川区西中島5丁目4番20号 中央ビル Osaka (JP).

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 鎌淵化学工業株式会社 (KANEKA CORPORATION) [JP/JP]; 〒530-8288 大阪府大阪市北区中之島3丁目2番4号 Osaka (JP).

(81) 指定国 (国内): AU, CA, CN, JP, RU, US.

添付公開書類:  
— 國際調査報告書

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 新名惇彦 (SHIN-MYO, Atsuhiko) [JP/JP]; 〒636-0151 奈良県生駒郡斑

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF INDUCING GENE EXPRESSION IN PLANT AND THE PLANT

(54) 発明の名称: 植物における遺伝子発現の誘導方法及びその植物

(57) Abstract: A method of inducing the expression of a gene under the regulation by an operator at an actinomycetes self-regulator provision site, which comprises imparting the characters of a repressor and an operator constituting a gene expression inducing system with the use of the actinomycetes self-regulator as an inducer to a plant by gene transfer, and then providing the actinomycetes self-regulator to the plant thus transformed. By using this method, a desired gene can be expressed at a desired point at a desired site of a plant, which makes it possible to produce a metabolite, which is even disadvantageous in the growth of the plant, in the plant. This method is also useful in controlling the fertility to thereby prevent transformed plants from scattering into the surroundings.

(57) 要約:

放線菌の自己調節因子をインデューサーとする遺伝子発現誘導系を構成するリプレッサー及びオペレーターの形質を遺伝子導入により植物に付与し、形質転換された植物に対し放線菌自己調節因子を投与することによって、オペレーターの支配下に置いた遺伝子の発現を放線菌自己調節因子投与部位において誘導する方法。この方法は、所望する遺伝子を所望する時期及び部位に発現させることができ、植物の生育にとって不利となるような代謝産物も植物で生産可能にする。稔性のコントロールを介して形質転換植物の環境への拡散を防止する上でも有用である。

WO 01/96581 A1



## 明細書

## 植物における遺伝子発現の誘導方法及びその植物

## 技術分野

5 本発明は、遺伝子組換え技術を利用した形質転換植物の作出を介する植物への遺伝子発現誘導系の付与に関する。

## 背景技術

遺伝子導入による植物への新たな形質の付与は形質転換と呼ばれる。導入された遺伝子が植物細胞内で発現することにより、付与された形質が表れる。遺伝子が細胞内染色体に組み込まれた場合、付与された形質は安定に維持される。遺伝子導入により新しく付与される形質には、例えば、疫病や農薬に対する抵抗性、植物本来の代謝の変換等がある。現在の遺伝子組換え技術では形質転換のために用いる遺伝子は自在に構築できる。このように構築された遺伝子を植物に導入するための方法もいくつか開発されている。遺伝子を効率よく植物細胞核染色体に組み込む場合には、遺伝子の運搬体（ベクター）として植物感染性細菌であるアグロバクテリウム（Agrobacterium）を利用するアグロバクテリウム感染法がある。

遺伝子の発現は、遺伝情報を保持する遺伝子本体であるDNAを錆型としてmRNAが写し取られる転写と呼ばれる段階、及びmRNAに写し取られた遺伝情報に基づいて蛋白質が合成される翻訳と呼ばれる段階を経る。遺伝子には、蛋白質情報をコードする領域の他に転写制御に関与する領域の存在が知られている。最も基本的な転写制御領域はコード領域の5'上流領域でプロモーターと呼ばれる。プロモーターの構造は植物等の真核生物と細菌等の原核生物では異なる。植物プロモーターは遺伝子の転写開始に必須なTATAボックスと呼ばれる塩基配列を持ち、他に様々な制御配列を有している。TATAボックスには植物細胞内で転写を触媒する酵素であるRNAポリメラーゼが転写を開始するために結合する。様々な制御配列にはこれらをターゲットとして、転写因子と呼ばれる細胞内

の様々な蛋白質因子が特異的に結合する。これらの転写因子がRNAポリメラーゼの転写活性を促進又は抑制することによって遺伝子発現をコントロールする。すなわち、遺伝子発現はこれら制御配列の支配下にある。これらの制御配列及び転写因子は転写段階を介した遺伝子発現の誘導にも関与している。

5 形質転換のために植物に導入した遺伝子の発現誘導を時期及び部位に関してコントロールすることは、植物の生育にとって不利となるような代謝産物も植物で生産可能になるため利点が大きい。このような目的のためにしばしば異種生物の遺伝子発現誘導系の利用が試みられる。植物内在の誘導系をそのまま利用することは、植物内の代謝系へ不測の影響を及ぼすおそれがあるからである。しかし、  
10 異種生物の遺伝子発現誘導系を植物に付与できるかどうかは自明ではない。

細菌のオペロン制御系に見られるインデューサー、リプレッサー及びオペレーターから成る制御系は主要な遺伝子発現誘導系の1つである。インデューサーは遺伝子発現を誘導する低分子化合物である。リプレッサーはインデューサーのレセプター蛋白質である。オペレーターはリプレッサーのターゲットとなる制御配列である。インデューサーとリプレッサーの結合、及びリプレッサーとオペレーターの結合はきわめて特異的であり親和性が高いが、インデューサーと結合したリプレッサーはオペレーターに結合できない。オペレーターをプロモーターに含有する、すなわち、オペレーターの支配下に置かれた遺伝子は、インデューサー低濃度下ではオペレーターに結合したリプレッサーのため発現が抑制されている  
20 (OFF) が、インデューサー濃度の増大に伴ってリプレッサーの離脱により発現が誘導される (ON)。

細菌のインデューサー/リプレッサー/オペレーター制御系を植物における遺伝子発現の誘導方法として利用する試みが報告されている。リプレッサー及びオペレーターの形質を植物に付与するため、リプレッサー遺伝子及びオペレーターの支配下に置いた遺伝子の2つの遺伝子を植物に導入する。両遺伝子とも植物細胞内で発現させるためには、そのプロモーターは植物プロモーターであることが望ましい。オペレーターは植物プロモーター中及び近傍に配置される。プロモーターを選ぶことで遺伝子発現強度や組織特異性等プロモーターの様々な特性と遺

伝子発現誘導性との機能的な組み合わせが可能がある。このように形質転換された植物に対しインデューサーを投与することによって、オペレーターの支配下に置いた遺伝子の発現をインデューサー投与部位において誘導する。このようなインデューサー／リプレッサー／オペレーター制御系の植物への付与に成功した例として、テトラサイクリン及びIPTGをインデューサーとする系に関する報告がある〔特開平6-339384及びGatz等, Trends in Plant Science (1998), 3, 352-358〕。しかし、これまでに報告されている例で用いられたインデューサー物質は環境安全性や使用コストの点で実用性に問題がある。

10

#### 発明の要約

本発明は上記現状に鑑み、形質転換のために植物に導入した遺伝子の発現誘導を時期及び部位に関してコントロールするための、植物における遺伝子発現の誘導方法を提供することを目的とする。

15 本発明は、植物における遺伝子発現の誘導方法であって、放線菌の自己調節因子をインデューサーとする遺伝子発現誘導系を構成するリプレッサー及びオペレーターの形質を遺伝子導入により植物に付与し、形質転換された植物に対し放線菌自己調節因子を投与することによって、オペレーターの支配下に置いた遺伝子の発現を放線菌自己調節因子投与部位において誘導する方法である。

20

以下、本発明を詳細に説明する。

#### 発明の詳細な開示

放線菌は真正細菌に次いで高密度に土壤中に存在し、抗生物質をはじめとする多くの生理活性物質を生産する。放線菌としては、例えば、ストレプトミセス (25 *Streptomyces*) 属、*Micromonospora* 属、*Actinomadura* 属、*Streptosporangium* 属、*Actinoplanes* 属、*Nocardia* 属、*Saccharopolyspora* 属等が挙げられる。放線菌の生理活性物質生産や形態分化は内因性微生物ホルモン様物

質、すなわち、自己調節因子によってコントロールされている。

これまでに知られている放線菌自己調節因子は、ストレプトミセス・グリセウス (*Streptomyces griseus*) のA因子 (A-factor) 、ストレプトミセス・バージニアエ (*Streptomyces virginiae*) のバージニアエ・ブタノライド (*virginiae butanoide* : VB) 及びストレプトミセス・ラベンデュラエ (*Streptomyces lavendulae*) FRI-5株の誘導物質2 (Inducing Material-2) の3種である [仁平, 酸酵工学会誌 (1991), 第69巻, 89-105]。

10 A因子は、生産菌における抗生物質ストレプトマイシン (*streptomycin*) 生産及びストレプトマイシン耐性を誘導し、分生胞子や気菌糸の形成も誘導する。VBは、生産菌における抗生物質バージニアマイシン (*virginiamycin*) の2種 (バージニアマイシンM及びバージニアマイシンS) の生産を同時に誘導する。誘導物質2は、生産菌における抗生物質生産の転換 (D-サイクロセリン (D-cycloserine) からヌクレオシド型抗生物質への転換) 、及び、炭素源、窒素源が不十分な状態での青色色素生産を誘導する。

放線菌自己調節因子は他の生物種に見られるホルモンやフェロモン等と同様に、その培養液中の濃度が極めて低い数nM-数10nMで活性を示す。

20 ストレプトミセス属放線菌の約60%は自己調節因子を生産していると推定されており、未知の自己調節因子はまだ数多く存在している可能性がある。

既知の放線菌自己調節因子は全て2-(1'-オクソ又はヒドロキシアルキル)-3-ヒドロキシメチルーブチロラクトン (2-(1'-oxo又はhydroxylalkyl)-3-hydroxymethyl-butyrolactone) 骨格を共通に持つ。このため、既知の放線菌自己調節因子はブチロラクトン型自己調節因子とも呼ばれる。ラクトン環上の2つの置換基は全てtransの立体構造であり、その絶対構造は2R及び3Rである。異なる点は2位のアルキル側鎖、6位がカルボニルか水酸基か、及びその水酸基の配向が $\alpha$  (誘導物質2型) か $\beta$  (VB型) かの3点である。

VBには、2位アルキル側鎖が異なる5種（A, B, C, D, E）の存在が知られている。人工的に合成した誘導体も活性を発揮する。2位側鎖の構造は活性の強弱に影響を与える。

放線菌自己調節因子の構造は比較的簡単であるため、その化学合成は容易である。各々の因子の生産菌を大量に純粋培養しその培養液から各々の因子を分離精製することも可能である。

A因子、VB及び誘導物質2には各々生産菌内に各々のレセプター蛋白質の存在が明らかになり、各々ArpA [Onaka等, J. Bacteriol. (1995), 177, 6083-6092]、BarA [Okamoto等, J. Biol. Chem. (1995), 270, 12319-12326]及びFaraA [Waki等, J. Bacteriol. (1997), 179, 5131-5137]と命名された。各々276個、232個及び221個のアミノ酸から成る。いずれのレセプター蛋白質もN末端にDNA結合性を示すヘリックス-ターン-ヘリックス・モチーフが見られる。

例えば、BarAのアミノ酸配列及びそれをコードする塩基配列は各々配列番号1及び2で示される。

放線菌自己調節因子とそのレセプター蛋白質の特異的結合力はきわめて高く、その解離定数（Kd値）は、例えば、A因子/ArpAの場合0.7nM、VB-C7/BarAの場合1.1nMである〔仁平, 酿酵工学会誌 (1991), 第69巻, 89-105〕。

例えば、VBのレセプター蛋白質BarAをコードするbarA遺伝子の3'下流及び5'上流には、barA遺伝子と共に遺伝子発現誘導系に支配されると思われるbarB及びbarXと名付けられた遺伝子の存在が各々明らかになった。これらの遺伝子がコードする蛋白質は現在のところ機能は明確でないが、生産菌のバージニアマイシン生合成やバージニアマイシン耐性、あるいはそれらの制御系に関与すると思われる。

in vivo実験 [Kinoshita等, J. Bacteriol. (1997), 179, 6986-6993]の結果、BarAはbarA及びba

r B各遺伝子のプロモーターに結合してこれらの遺伝子の転写をOFFにするリプレッサーであり、VBはBarAをプロモーターから離脱させることでこれらの遺伝子の転写をONにするインデューサーであることが示された。また、in vitro実験 [Kinoshita等, J. Bacteriol. (1999), 181, 5075-5080] の結果、BarAが特異的に結合するターゲット配列（オペレーター）がbarA及びbarB各遺伝子上で同定され、BAREと命名された。barA遺伝子プロモーターのBARE-3 (26 bp)、barB遺伝子プロモーターのBARE-1 (29 bp) 及びBARE-2 (28 bp) である。例えば、BARE-3の塩基配列は配列番号3で示される。

10 このように、放線菌の自己調節因子は、生産菌内において遺伝子発現誘導系に関与することが明らかになった。この遺伝子発現誘導系はインデューサー、リプレッサー及びオペレーターから成る。放線菌自己調節因子、放線菌自己調節因子のレセプター蛋白質及びレセプター蛋白質のターゲット配列が各々インデューサー、リプレッサー及びオペレーターとして機能する。

15 本発明では、放線菌の自己調節因子をインデューサーとする遺伝子発現誘導系を構成するリプレッサー及びオペレーターの形質を遺伝子導入により植物に付与する。本発明で用いられる植物としては、タバコ、トウモロコシ、ダイズ、ナタネ、ジャガイモ、ワタなどが挙げられる。

20 ここで言うリプレッサーの形質の付与とは、リプレッサー遺伝子の導入による植物の形質転換を意味する。また、オペレーターの形質の付与とは、オペレーターの支配下に置いた遺伝子の導入による植物の形質転換を意味する。

すなわち、本発明では、放線菌自己調節因子のレセプター蛋白質の遺伝子及びレセプター蛋白質のターゲット配列の支配下に置いた遺伝子の2つの遺伝子を形質転換のために植物に導入する。

25 放線菌自己調節因子のレセプター蛋白質（リプレッサー）の遺伝子を形質転換のために植物に導入するには、レセプター蛋白質遺伝子のコード領域を、植物で機能するプロモーターの3'下流に連結し、これを適当なプラスミド・ベクターに組み込む。ここで用いるプロモーターとしては、植物プロモーターが好ましい。

例えば、多くの種の植物で強力なプロモーター活性を発揮することが知られているカリフラワー・モザイク・ウィルス (C a u l i f l o w e r m o s a i c v i r u s : CaMV) 35Sプロモーターの利用は、植物での強力で構成的な遺伝子の発現に有効である。この他の植物プロモーターとしては、アグロバクテリウム起源のオペイン (ノパリン、オクトピン、マンノピン) 合成酵素遺伝子プロモーター等が挙げられるが、これに限定されることなく、一般的な植物プロモーターを使用することができる。

10 例えば、アグロバクテリウム感染法を用いる植物への遺伝子導入では、バイナリー・ベクターと呼ばれるプラスミド・ベクターに目的の遺伝子を組み込む。バイナリー・ベクターは、大腸菌内及びアグロバクテリウム内複製系、及び選択マーカー遺伝子に加えて、植物細胞核染色体への遺伝子の組み込みに必須なRB及びLBと呼ばれる25bpの塩基配列を保有する。バイナリー・ベクターのRB-LB間に挿入された遺伝子は、植物細胞に導入されると効率良く核染色体に組み込まれる。

15 例えば、CaMV 35Sプロモーターの3'下流にβ-グルクロニダーゼ ( $\beta$ -glucuronidase : GUS) 遺伝子コード領域が連結された構造を持つバイナリー・ベクターであるpBI121 [Jefferson等, EMB O J. (1987), 6, 3901-3907] 等のGUS遺伝子コード領域をbarA遺伝子のコード領域に変換することで、放線菌自己調節因子VBのレセプター蛋白質 (リプレッサー) barAの遺伝子を形質転換のために植物に導入するためのバイナリー・ベクターを構築できる。例えば、両端に制限酵素BamHI及びSacIの認識部位を持つbarA遺伝子コード領域断片を準備すれば、制限酵素BamHI及びSacIの認識部位を介してバイナリー・ベクターpBI121のGUS遺伝子コード領域をbarA遺伝子コード領域に変換できる。例えば、配列番号8及び9で示される塩基配列から成る化学合成オリゴDNAを各々5' - 及び3' - PCRプライマーとし、配列番号1で示されるbarA遺伝子を含むプラスミドpET-p26k [Okamoto等, J. Biol. Chem. (1995), 270, 12319-12326] を鋳型としてPC

Rを行えば、両端に制限酵素B a mH I 及びS a c I の認識部位を持つb a r A遺伝子コード領域断片を得ることができる。

放線菌自己調節因子レセプター蛋白質のターゲット配列（オペレーター）の支配下に置いた遺伝子を形質転換のために植物に導入するには、ターゲット配列を5 植物で機能するプロモーターに配置し、このように改変したプロモーターの3'下流に所望する任意の遺伝子のコード領域を連結し、これを適當なプラスミド・ベクターに組み込む。ここで用いるプロモーターとしては、植物プロモーターが好ましい。

ターゲット配列（オペレーター）はプロモーターのT A T Aボックスの3'下流近傍又は5'上流近傍に配置することが望ましく、複数配置する方が効果的である。

例えば、バイナリー・ベクターp B I 1 2 1等のC a M V 3 5 Sプロモーターに塩基配列B A R Eを配置することで、V B レセプター蛋白質B a r Aのターゲット配列（オペレーター）B A R Eの支配下に置いたG U S遺伝子を形質転換のために植物に導入するためのバイナリー・ベクターを構築できる。G U S遺伝子はそのコードする酵素の活性検出が容易であり植物内にホモログもないため、植物細胞内の遺伝子発現活性を実験で検出するためのレポーター遺伝子として広く利用される。ターゲット配列（オペレーター）のプロモーターへの配置は、例えば、配置部位を挟んで適當な制限酵素認識部位がある場合には、その制限酵素認識部位間の塩基配列から成る2本鎖D N A断片を合成することで達成できる。あるいは化学合成オリゴD N Aを利用した部分特異的変異導入技術によっても可能である。例えば、配列番号3で示されるB A R E-3をC a M V 3 5 SプロモーターのT A T Aボックスの3'下流近傍又は5'上流近傍に配置するには、例えば、配列番号4又は5で示される塩基配列から成る2本鎖D N A断片を各々合成すればよい。例えば、B A R E-3をC a M V 3 5 SプロモーターのT A T Aボックスの3'下流近傍及び5'上流近傍に配置するには、例えば、配列番号6で示される塩基配列から成る2本鎖D N A断片を合成すればよい。例えば、B A R E-3をC a M V 3 5 SプロモーターのT A T Aボックスの3'下流近傍及び5'

’ 上流近傍に多数配置するには、例えば、配列番号 7 で示される塩基配列から成る 2 本鎖 DNA 断片を合成すればよい。例えば、B A R E - 3 を C a M V 3 5 S プロモーターの T A T A ボックスの 3' 下流近傍に 2 個及び 5' 上流近傍に 1 個配置されている配列番号 7 で示される塩基配列から成る 2 本鎖 DNA 断片を合成するには、互いに 3' 末端が 1 6 b p にわたって相補的な、配列番号 1 0 及び 1 1 で示される塩基配列から成る化学合成オリゴ DNA を試験管内で混合後、相補末端をアニールさせる。これに DNA ポリメラーゼを添加し、合成された 2 本鎖 DNA 断片を制限酵素 E c o R V と X b a I で処理後、適当なプラスミド・ベクターにクローニングする。

10 本発明では、以上のように構築したプラスミド・ベクターを形質転換のために植物に導入する。

例えば、アグロバクテリウム感染法を用いる植物への遺伝子の導入では、以上のように構築したバイナリー・ベクターの導入により一旦アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) 又はアグロバクテリウム・リゾゲネス (*Agrobacterium rhizogenes*) を形質転換する。これには、電気穿孔法等の方法が有効である。この時に用いるアグロバクテリウムは、バイナリー・ベクターの R B - L B 間領域を植物細胞核染色体へ組み込むのに必要な機能を保有している必要がある。形質転換されたアグロバクテリウムはバイナリー・ベクター中の選択マーカー遺伝子の働きを利用して容易に選抜できる。こうして所望する遺伝子を含有するバイナリー・ベクターを導入した形質転換アグロバクテリウムを植物へ感染させる。このために、植物組織片を形質転換アグロバクテリウムと共に培養する。その後組織片からカルスを誘導する。この時、選択マーカー薬剤に加えカルベニシリン (carbenicillin) 等のアグロバクテリウムを殺すための抗生物質も共存させる。選択マーカー遺伝子には、例えば、カナマイシン (kanamycin) 、ハイグロマイシン (hygromycin) 、ブレオマイシン (bleomycin) 、クロラムフェニコール (chloramphenicol) 等の抗生物質に耐性を与える遺伝子が利用できる。こうして得られる形質転換カル

スを再生培地に置き、植物を再生させることにより形質転換植物が得られる。形質転換植物の種子から形質転換植物系統も得ることができる。

同様にして、形質転換植物培養細胞も得ることができる。ただし、この場合、カルス形成や植物体の再生、あるいは種子形成等のステップを経由する必要はない。

植物への遺伝子導入法には、アグロバクテリウム感染法以外にもプロトプラストへ遺伝子を導入する電気穿孔法、遺伝子銃を用いるパーティクル・ボンバードメント法、微細キャピラリーを用いて遺伝子を直接細胞に注入するマイクロ・インジェクション法等があり、本発明が提供する遺伝子発現誘導法の実施には、いずれの遺伝子導入法も利用可能である。

このようにして得られる形質転換植物において、核染色体に挿入された遺伝子及び遺伝子産物の存在はPCR及びウェスタン解析により各々容易に確かめることができる。

放線菌自己調節因子のレセプター蛋白質（リプレッサー）の遺伝子、あるいはレセプター蛋白質のターゲット配列（オペレーター）の支配下に置いた遺伝子の導入により各々形質転換植物を得ることが可能であるが、選択マーカー遺伝子を違えたプラスミド・ベクターを各々の形質転換に順次用いる方法や両遺伝子を組み込んだプラスミド・ベクターを用いる方法により、両遺伝子が導入された形質転換植物の取得が可能である。

本発明では、このように形質転換された植物に対し放線菌自己調節因子を投与することによって、オペレーターの支配下に置いた遺伝子の発現を放線菌自己調節因子投与部位において誘導する。

例えば、放線菌ストレプトミセス・バージニアエの自己調節因子VBをインデューサーとする遺伝子発現誘導系を構成するリプレッサーBarA（VBのレセプター蛋白質）及びオペレーターBARE-3（BarAのターゲット配列の1つ）の形質を遺伝子導入によりタバコ及びタバコ培養細胞に付与し、形質転換されたタバコ及びタバコ培養細胞に対しVBを投与することによって、BARE-3の支配下に置いた遺伝子の発現をVB投与部位において誘導することができた。

例えば、VBは100nMという低濃度で十分にBARE-3の支配下に置いた遺伝子の発現を誘導することができた。

放線菌自己調節因子は疎水性構造に加え分子量が概ね200と比較的小さいため細胞膜を容易に通過できる。したがって、植物内への速やかな吸収が望まれる

5 インデューサーとして非常に適している。

放線菌自己調節因子は植物に対する毒性がない。例えば、VBは10μMの濃度でも植物に対する毒性を示さない。

本発明では、オペレーターの支配下に置く遺伝子の選択により、有用な形質転換植物の作出及び形質転換植物の有効な利用が可能である。例えば、植物に

10 稳性形質を付与する遺伝子をオペレーターの支配下に置くことにより、上記形質転換された植物に対し放線菌自己調節因子を投与することで、その植物の稳性をコントロールすることができる。このような植物は、例えば、形質転換のための宿主として用いることで形質転換植物の自然環境への拡散を効率よく防ぐために利用できる。

15

#### 図面の簡単な説明

図1は、実施例3において、放線菌ストレプトミセス・バージニアエの自己調節因子VBをインデューサーとする遺伝子発現誘導系を構成するリプレッサーB

a r A (VBのレセプター蛋白質)の形質を遺伝子導入によりタバコ培養細胞に

20 付与し、形質転換されたタバコ培養細胞においてBarA蛋白質が蓄積しているかどうかをウェスタン・ブロッティング法により解析した結果を示す。

(符号の説明)

M: 分子量マーカー

R: 遺伝子組換え大腸菌を用いて作製し精製したBarA蛋白質10ng

25 30, 21, 27: 得られた形質転換タバコ培養細胞クローニングの識別番号

B: タバコ培養細胞BY2

T: 得られた一過的形質転換タバコ培養細胞プロトプラスト(実施例5)

矢印: BarA蛋白質を表すバンドの位置

図2は、実施例4において、放線菌ストレプトミセス・バージニアエの自己調節因子VBをインデューサーとする遺伝子発現誘導系を構成するリプレッサーBarA (VBのレセプター蛋白質) 及びオペレーターBARE-3 (BarAのターゲット配列の1つ) の形質を遺伝子導入によりタバコ培養細胞に付与し、形質転換されたタバコ培養細胞に対しVBを投与することによって、BARE-3の支配下に置いたGUSレポーター遺伝子の発現が誘導されるかどうかを調べた結果を示す。

(符号の説明)

10 GUS specific activity (グラフの縦軸) : GUS遺伝子発現活性の評価に用いたGUS比活性 (単位は [nmol 4MU/min/mg protein])

30-16, 30-17, 30-23, 30-35, 21-5, 21-21, 21-22, 27-1, 27-9 : 得られた形質転換タバコ培養細胞クローンの識

15 別番号

OFF (VB-) : VB無添加時

ON (VB+) : VB添加時 (VB-C<sub>6</sub>最終濃度: 1 μM)

図3は、実施例5において、放線菌ストレプトミセス・バージニアエの自己調節因子VBをインデューサーとする遺伝子発現誘導系を構成するリプレッサーBarA (VBのレセプター蛋白質) 及びオペレーターBARE-3 (BarAのターゲット配列の1つ) の形質を遺伝子導入によりタバコ培養細胞に付与し、一過的に形質転換されたタバコ培養細胞に対しVBを投与することによって、BARE-3の支配下に置いたGUSレポーター遺伝子の発現が誘導されるかどうかを調べた結果 (その1) を示す。

(符号の説明)

Induction rate (グラフの縦軸) : VB添加時 (VB-C<sub>6</sub>最終濃度: 1 μM, ON) の無添加時 (OFF) に対するGUS遺伝子発現活性の比 (

G U S 遺伝子発現活性 (O N) / G U S 遺伝子発現活性 (O F F) で表したV Bによる遺伝子発現誘導活性

3 5 S : B A R E - 3 の支配下にないG U S レポーター遺伝子を一過的な形質転換に用いた場合

5 3 5 S D : B A R E - 3 の支配下に置いたG U S レポーター遺伝子としてプラスミド p C a M V 3 5 S D - g u s を一過的な形質転換に用いた場合

3 5 S U D D : B A R E - 3 の支配下に置いたG U S レポーター遺伝子としてプラスミド p C a M V 3 5 S U D D - g u s を一過的な形質転換に用いた場合

b a r A - : b a r A 遺伝子を一過的な形質転換に用いなかった場合

10 10 b a r A + : b a r A 遺伝子を一過的な形質転換に用いた場合

図4は、実施例6において、放線菌ストレプトミセス・バージニアエの自己調節因子V Bをインデューサーとする遺伝子発現誘導系を構成するリプレッサーB a r A (V Bのレセプター蛋白質)及びオペレーターB A R E - 3 (B a r Aのターゲット配列の1つ)の形質を遺伝子導入によりタバコ培養細胞に付与し、一過的に形質転換されたタバコ培養細胞に対しV Bを投与することによって、B A R E - 3 の支配下に置いたG U S レポーター遺伝子の発現が誘導されるかどうかを調べた結果(その2)を示す。

(符号の説明)

20 I n d u c t i o n r a t e (グラフの縦軸) : V B添加時 (V B - C<sub>6</sub>最終濃度: 1 μM, O N) の無添加時 (O F F) に対するG U S 遺伝子発現活性の比 (G U S 遺伝子発現活性 (O N) / G U S 遺伝子発現活性 (O F F) ) で表したV Bによる遺伝子発現誘導活性

3 5 S : B A R E - 3 の支配下にないG U S レポーター遺伝子を一過的な形質転換に用いた場合

3 5 S U : B A R E - 3 の支配下に置いたG U S レポーター遺伝子としてプラスミド p C a M V 3 5 S U - g u s を一過的な形質転換に用いた場合

3 5 S D : B A R E - 3 の支配下に置いたG U S レポーター遺伝子としてプラス

ミド p CaMV 35SD-gus を一過的な形質転換に用いた場合

35SUD : BARE-3 の支配下に置いた GUS レポーター遺伝子としてプラス

ミド p CaMV 35SUD-gus を一過的な形質転換に用いた場合

35SUDD : BARE-3 の支配下に置いた GUS レポーター遺伝子としてプ

5 ラスミド p CaMV 35SUDD-gus を一過的な形質転換に用いた場合

図 5 は、実施例 7 において、放線菌ストレプトミセス・バージニアエの自己調節因子 VB をインデューサーとする遺伝子発現誘導系を構成するリプレッサー BarA (VB のレセプター蛋白質) 及びオペレーター BARE-3 (BarA のターゲット配列の 1 つ) の形質を遺伝子導入によりタバコ培養細胞に付与し、一過的に形質転換されたタバコ培養細胞に対し低濃度の VB を投与することによって、BARE-3 の支配下に置いた GUS レポーター遺伝子の発現が誘導されるかどうかを調べた結果を示す。

(符号の説明)

15 Induction rate (グラフの縦軸) : VB 添加時 (ON) の無添加時 (OFF) に対する GUS 遺伝子発現活性の比 (GUS 遺伝子発現活性 (ON) / GUS 遺伝子発現活性 (OFF)) で表した VB による遺伝子発現誘導活性

35SD : BARE-3 の支配下に置いた GUS レポーター遺伝子としてプラスミド p CaMV 35SD-gus を一過的な形質転換に用いた場合

20 0 nM : VB 無添加時 (OFF)

10 nM : VB 添加時 (ON, VB-C<sub>6</sub> 最終濃度 : 10 nM)

100 nM : VB 添加時 (ON, VB-C<sub>6</sub> 最終濃度 : 100 nM)

1000 nM : VB 添加時 (ON, VB-C<sub>6</sub> 最終濃度 : 1000 nM = 1 μM)

25 図 6 は、実施例 10 において、放線菌ストレプトミセス・バージニアエの自己調節因子 VB をインデューサーとする遺伝子発現誘導系を構成するリプレッサー BarA (VB のレセプター蛋白質) 及びオペレーター BARE-3 (BarA のターゲット配列の 1 つ) の形質を遺伝子導入によりタバコに付与し、形質転換

されたタバコに対しVBを投与することによって、B A R E - 3 の支配下に置いたG U S レポーター遺伝子の発現が誘導されるかどうかを調べた結果を示す。

(符号の説明)

OFF (VB-) : VB無添加時

5 ON (VB+) : VB添加時 (VB-C<sub>6</sub>最終濃度: 1 μM)

### 発明を実施するための最良の形態

以下に実施例を掲げて本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれら実施例のみに限定されるものではない。

10 (実施例 1)

放線菌ストレプトミセス・バージニアエ (*S t r e p t o m y c e s v i r g i n i a e*) の自己調節因子バージニアエ・ブタノライド (*v i r g i n i a e b u t a n o l i d e* : VB) をインデューサーとする遺伝子発現誘導系を構成するリプレッサーB a r A (VBのレセプター蛋白質) の形質を遺伝子導入により植物に付与する、すなわち、リプレッサーb a r A遺伝子を形質転換のために植物に導入するためのプラスミド・ベクターを構築した。

このために配列番号1で示されるb a r A遺伝子を含有するプラスミドp E T - p 2 6 k [Okamoto等, *J. Biol. Chem.* (1995), 270, 12319-12326] から、b a r A遺伝子コード領域をPCRにより20クローニングした。PCRの5' - 及び3' - プライマーには、各々制限酵素B a m H I 及びS a c I 認識配列を導入した各々配列番号8及び9で示される塩基配列から成る化学合成オリゴDNAを用いた。PCRで増幅した断片を制限酵素B a m H I とS a c I で処理後、クローニング用プラスミド・ベクターp B l u e s c r i p t I I S K (-) [ジェンバンク (GenBank) アクセション番号X 5 2 3 3 0] のマルチ・クローニング領域内制限酵素B a m H I 認識部位-S a c I 認識部位間に挿入した (プラスミドp b a r A)。b a r A遺伝子コード領域が正しくクローニングされたことをシーケンシングにより確認した。

カリフラワー・モザイク・ウィルス (C a u l i f l o w e r m o s a i c v i r u s : CaMV) 35Sプロモーターの3'下流に $\beta$ -グルクロニダーゼ ( $\beta$ -g l u c u r o n i d a s e : GUS) 遺伝子コード領域が連結された構造を持ち選択マーカー遺伝子としてカナマイシン耐性遺伝子を有するバイナリ  
5 ー・ベクター p B I 1 2 1 [Jefferson等, EMBO J. (1987), 6, 3901-3907] から制限酵素B a m H I と S a c I の処理により、GUS遺伝子コード領域を含む制限酵素B a m H I - S a c I 断片を除去し、残ったベクター断片に、プラスミドp b a r Aから制限酵素B a m H I と S a c I の処理により切り出したb a r A遺伝子コード領域を含む制限酵素B a m H I -  
10 S a c I 断片をライゲーションした (バイナリー・ベクター p B I C a M V 35 S - b a r A)。

リプレッサーb a r A遺伝子を一過的な形質転換のために植物に導入するためのプラスミド・ベクターも構築した。タバコのアルコール脱水素酵素 (N i c o t i a n a t a b a c u m a l c o h o l d e h y d r o g e n a s e : N t A D H) のプロモーターの3'下流にGUS遺伝子コード領域が連結された構造を持つプラスミドN t A D H p - G U S [Nagaya等, J. Biosc. Bioeng. (2000), 89, 231-235] を材料にした。このプラスミドのN t A D Hプロモーターはタバコで非常に強力なプロモーター活性を発揮することが知られている。

20 プラスミドN t A D H p - G U Sから制限酵素B a m H I と S a c I の処理により、GUS遺伝子コード領域を含む制限酵素B a m H I - S a c I 断片を除去し、残ったベクター断片に、プラスミドp b a r Aから制限酵素B a m H I と S a c I の処理により切り出したb a r A遺伝子コード領域を含む制限酵素B a m H I - S a c I 断片をライゲーションした (プラスミドp N t A D H - b a r A )。

25 プラスミドN t A D H p - G U Sから制限酵素B a m H I と S a c I の処理により、GUS遺伝子コード領域を含む制限酵素B a m H I - S a c I 断片を除去し、残ったベクター断片の末端を平滑処理後ライゲーションした (プラスミドp

NtADHΔBS)。

組換えDNA実験の宿主には大腸菌DH5 $\alpha$ 株 [supE44, ΔlacU169 (φ80, lacZΔM15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1] を用いた。方法は標準法 [Molecular Cloning, Maniatis等, 1982, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.] にしたがった。

PCRにはKOD DNAポリメラーゼ [東洋紡績(株)] を用い、条件はそのマニュアルにしたがった。

10 シーケンシングは、シーケンサー [ピー・イー・バイオシステムズ・ジャパン(株) ABI PRISM 310 Genetic Analyzer] を用いて実施した。

(実施例2)

15 放線菌ストレプトミセス・バージニアエの自己調節因子VBをインデューサーとする遺伝子発現誘導系を構成するオペレーターBARE-3 (VBのレセプター蛋白質BarAのターゲット配列の1つ) の形質を遺伝子導入により植物に付与する、すなわち、オペレーターBARE-3の支配下に置いたGUSレポーター遺伝子を形質転換のために植物に導入するためのプラスミド・ベクターを構築20 した。

BARE-3は、CaMV35SプロモーターのTATAボックスの3'下流近傍に2個及び5'上流近傍に1個配置した。

このために、CaMV35SプロモーターのTATAボックス (5' - TATAATAA-3') を含む制限酵素EcoRV-XbaI断片 (CaMV35Sプロモーター871bpの762番目の塩基から871番目の塩基までの断片) で、TATAボックスの5'上流2番目の塩基から27番目の塩基までの26bpとTATAボックスの3'下流2番目の塩基から27番目の塩基までの26bpが各々配列番号3で示されるBARE-3 (26bp) に置換され、更にTATA

ボックスの3'下流27番目の塩基と28番目の塩基の間にBARE-3 (26 bp) が挿入された、配列番号7で示される塩基配列から成る2本鎖DNA断片を合成した。互いに3'末端が16 bpにわたって相補的な配列番号10及び11で示される塩基配列から成る化学合成オリゴDNAを、各々100 pmolずつ10  $\mu$ lのTE溶液に混合し95°Cに3分間保持後、室温まで冷却した。この溶液2  $\mu$ lに大腸菌DNAポリメラーゼIクレノー断片 (Klenow fragment) を加え全量を40  $\mu$ lとした反応液を37°Cに30分間保持し、フェノール/クロロホルム処理により酵素を失活させた反応液のエタノール沈殿物を5  $\mu$ lのTE溶液に溶かした。この溶液2  $\mu$ lに制限酵素EcoRVとXbaIを作用させて得られた制限酵素EcoRV-XbaI断片をクローニング用プラスミド・ベクターpBlue script II SK (-) のマルチ・クローニング領域内制限酵素EcoRV認識部位-XbaI認識部位間に挿入した(プラスミドpBARE3UDD)。BARE-3が正しく配置されたことをシーケンシングにより確認した。

BARE-3がTATAボックスの3'下流近傍に2個及び5'上流近傍に1個配置されている構造のCaMV35Sプロモーターを構築するために、CaMV35Sプロモーターの3'下流にGUS遺伝子コード領域が連結された構造を持つプラスミドpBI221 [Jefferson等, EMBO J. (1987), 6, 3901-3907] から制限酵素HindIIIとEcoRVの処理により切り出したCaMV35Sプロモーターの1番目の塩基から761番目の塩基までの断片をプラスミドpBARE3UDDの制限酵素HindIII認識部位-EcoRV認識部位間に挿入した(プラスミドpCaMV35SUDD)。

CaMV35Sプロモーターの3'下流にGUS遺伝子コード領域が連結された構造を持ち選択マーカー遺伝子としてハイグロマイシン耐性遺伝子も有するバイナリー・ベクターpBI101HmB [Nakayama等, Plant Physiol. (2000), 122, 1239-1247] から制限酵素HindIIIとXbaIの処理により、CaMV35Sプロモーターを含む制限酵

素H i n d I I I - X b a I 断片を除去し、残ったベクター断片に、プラスミドp C a M V 3 5 S U D D から制限酵素H i n d I I I とX b a I の処理により切り出した、B A R E - 3 がT A T A ボックスの3' 下流近傍に2個及び5' 上流近傍に1個配置されている構造のC a M V 3 5 S プロモーターを含む制限酵素H 5 i n d I I I - X b a I 断片をライゲーションした（バイナリー・ベクターp B I C a M V 3 5 S U D D - g u s）。

オペレーターB A R E - 3 の支配下に置いたG U S レポーター遺伝子を一過的な形質転換のために植物に導入するためのプラスミド・ベクターも構築した。

B A R E - 3 は、C a M V 3 5 S プロモーターのT A T A ボックスの3' 下流10近傍に2個及び5' 上流近傍に1個配置した。

プラスミドp B I 2 2 1 から制限酵素H i n d I I I とX b a I の処理により、C a M V 3 5 S プロモーターを含む制限酵素H i n d I I I - X b a I 断片を除去し、残ったベクター断片に、プラスミドp C a M V 3 5 S U D D から制限酵素H i n d I I I とX b a I の処理により切り出したB A R E - 3 をT A T A ボックスの3' 下流近傍に2個及び5' 上流近傍に1個配置されている構造のC a M 15 V 3 5 S プロモーターを含む制限酵素H i n d I I I - X b a I 断片をライゲーションした（プラスミドp C a M V 3 5 S U D D - g u s）。

同様にして、B A R E - 3 がT A T A ボックスの3' 下流近傍に1個配置されている配列番号4で示される構造、T A T A ボックスの5' 上流近傍に1個配置20されている配列番号5で示される構造、及びT A T A ボックスの3' 下流近傍及び5' 上流近傍に1個ずつ配置されている配列番号6で示される構造のC a M V 3 5 S プロモーターを各々持つプラスミド・ベクターも構築した（プラスミドp C a M V 3 5 S D - g u s、p C a M V 3 5 S U - g u s 及びp C a M V 3 5 S U D - g u s）。

25

（実施例3）

放線菌ストレプトミセス・バージニアエの自己調節因子V B をインデューサーとする遺伝子発現誘導系を構成するリプレッサーB a r A (V B のレセプター蛋

白質) の形質を遺伝子導入によりタバコ培養細胞に付与した。すなわち、リプレッサー *b a r A* 遺伝子を形質転換のためにタバコ培養細胞に導入した。

遺伝子導入にはアグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 感染法を用いた。*b a r A* 遺伝子の導入により一旦アグロバクテリウムを形質転換し、得られた形質転換アグロバクテリウムをタバコ培養細胞へ感染させた。

アグロバクテリウムへの遺伝子導入には電気穿孔法を用いた。アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) EHA101株 [Elizabeth等, *J. Bacteriol.* (1986), 168, 1291-1301] のコンピテント・セル  $50\mu\text{l}$  を *b a r A* 遺伝子 (実施例1, バイナリー・ベクター pBICaMV35S-*b a r A*)  $200\text{ng}$  と混合しジーン・パルサー [日本バイオ・ラッド・ラボラトリーズ (株)] のキュベット (電極間距離が  $2\text{mm}$ ) に移した。電圧  $2.5\text{kV}$ 、静電容量  $25\mu\text{FD}$  及び抵抗  $400\Omega$  に設定したパルスをキュベット電極間に発生させた。パルス発生時の時定数は約  $10\text{ミリ秒}$  であった。パルスを負荷したキュベットの内容物全量を、 $100\text{mg}/1$  のカナマイシン (*kanamycin*) を含む LB 培地寒天プレートに塗布し、このプレートを  $30^\circ\text{C}$  の暗所に静置した。2日後にプレート上に形成したコロニーを、 $100\text{mg}/1$  のカナマイシンを含む  $5\text{ml}$  の LB 培地を用いて、 $30^\circ\text{C}$  の暗所で 2 日間振盪培養した。この培養液を形質転換アグロバクテリウム培養液とした。

得られた形質転換アグロバクテリウムをタバコ培養細胞 BY2 (理化学研究所ジーン・バンク (RIKEN Gene Bank) 植物細胞開発銀行 (Plant Cell Bank) RPC番号1) [Nagata等, *Methods Enzymol.* (1987), 148, 34-39] へ感染させた。タバコ培養細胞 BY2 は、改変 LS 培地 [Nagata等, *Methods Enzymol.* (1987), 148, 34-39] を用いた  $27^\circ\text{C}$  の暗所での振盪培養により約  $1/50$  希釈-約 1 週間周期で継代し、対数増殖期 (継代後 3-5 日目) の細胞をアグロバクテリウムの感染に用いた。タバコ培養細胞 BY2 を含む培養液  $5\text{ml}$  を、形質転換アグロバクテリウム培養液  $100\mu\text{l}$  と混合しシャー

レに移し、このシャーレを25℃の暗所に静置した。2日後、シャーレ内容物から遠心分離によりアグロバクテリウムを除去し、残ったタバコBY2細胞を2-3mlの改変LS培地に懸濁後、カナマイシン(kanamycin)100mg/1及びカルベニシリン(carbenicillin)250mg/1を含む改変LS培地ゲランガム・プレートに塗布し、このプレートを25℃の暗所に静置した。2-3週間後にプレート上に形成したカルスを分離、形質転換タバコ培養細胞としてカナマイシン及びカルベニシリン存在下で継代維持した。

10 このようにして得られた形質転換タバコ培養細胞においてリプレッサーBar A蛋白質が蓄積しているかどうかをウェスタン・ブロッティング法により解析した。

形質転換タバコ培養細胞を適当な細胞抽出用緩衝液(例えば、0.1M KPO4, 2mM EDTA, 5%グリセロール, 2mM DTT, pH7.8)に懸濁し、超音波発生装置[(株)トミー精工 Handy Sonic UR-20P]を用いて破碎した。細胞破碎液を高速遠心分離して得られた上澄みを細胞抽出液とした。細胞抽出液の蛋白質濃度(mg/ml)は、ブラッドフォードの方法[BradfordのAnal. Biochem. (1976)、72、248-254]により測定した。蛋白質20μg/レーンに相当する細胞抽出液をSDS-PAGE(12.5%ポリアクリルアミド・ゲル)で分離後、PVDFメンブレン[日本バイオ・ラッド・ラボラトリーズ(株)]に転写し、抗体に反応させた。1次抗体にはウサギ抗Bar A抗体[Nakano等, J. Bacteriol. (1998), 180, 3317-3322]、2次抗体にはアルカリ・fosphaターゼ(alkaline phosphatase)標識ヤギ抗ウサギIgG抗体を各々用いた。各反応及び洗浄は3%のスキム・ミルク存在下で行った。最後にアルカリ・fosphaターゼ反応液(0.017%25-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル・リン酸p-トルイジン(5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate p-toluidine salt)、1ppmニトロ・ブルー・テトラゾリウム(nitro blue tetrazolium)、100mM Tris-H

C<sub>l</sub>、100mM NaCl、5mM MgCl<sub>2</sub>、pH 9.5) にメンブレンを浸し、メンブレンに発色するバンドを検出した。遺伝子組換え大腸菌を用いて作製し精製したBarA蛋白質10ngを対照サンプルに用いた。

この結果、いくつかの形質転換タバコ培養細胞クローンでBarA蛋白質の蓄積を確認した(図1)。

(実施例4)

放線菌ストレプトミセス・バージニアエの自己調節因子VBをインデューサーとする遺伝子発現誘導系を構成するリプレッサーBarA (VBのレセプター蛋白質) 及びオペレーターBARE-3 (BarAのターゲット配列の1つ) の形質を遺伝子導入によりタバコ培養細胞に付与した。すなわち、リプレッサーbarA遺伝子及びオペレーターBARE-3の支配下に置いたGUSレポーター遺伝子の2つの遺伝子を形質転換のためにタバコ培養細胞に導入した。

barA遺伝子(実施例1, バイナリー・ベクターpBICaMV35S-barA)をタバコ培養細胞BY2に導入し、得られた形質転換タバコ培養細胞(実施例3)のうち、ウェスタン解析からBarA蛋白質を比較的高蓄積していると思われるクローン(図1に示した30番及び21番)及びBarA蛋白質を少量しか蓄積していないと思われるクローン(図1に示した27番)に、更に、BARE-3の支配下に置いたGUSレポーター遺伝子(実施例2, バイナリー・ベクターpBICaMV35S UDD-gus)を導入した。遺伝子導入には実施例3と同様にアグロバクテリウム感染法を用いた。形質転換タバコ培養細胞は、ハイグロマイシン(hygromycin) 20mg/l、カナマイシン(kanamycin) 100mg/l及びカルベニシリン(carbenicillin) 250mg/lを含む改変LS培地で選択、継代維持した。

このようにして得られた形質転換タバコ培養細胞に対しインデューサーVBを投与することによって、オペレーターBARE-3の支配下に置いたGUSレポーター遺伝子の発現が誘導されるかどうかを調べた。

形質転換タバコ培養細胞を、改変LS培地を用いた27℃の暗所での振盪培養

により約1/25希釈—約1週間周期で継代し、継代時にVBを添加後4日間培養した細胞から調製した細胞抽出液のGUS遺伝子発現活性（単位蛋白質量当たりのGUS活性、すなわち、GUS比活性を用いて評価）をVB無添加のそれと比較した。VBの添加は、VB-C<sub>6</sub>〔仁平、醸酵工学会誌（1991），第69卷，89-105〕原液（10mg/mlメタノール溶液）を水で1/50に希釈したものを培地に1/1000容量加えることで実施した（VB-C<sub>6</sub>最終濃度：約1μM）。細胞懸濁液1mlから、遠心分離により上澄みを除いた細胞を500μlの細胞抽出用緩衝液（50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10mM EDTA, 10mM 2-メルカプト・エタノール, pH7）に懸濁し超音波発生装置〔（株）トミー精工 Handy Sonic UR-20P〕を用いて破碎した。細胞破碎液を高速遠心分離して得られた上澄みを細胞抽出液とした。細胞抽出液の蛋白質濃度（mg/ml）は、プラッドフォードの方法により測定した。細胞抽出液のGUS活性〔Jefferson等, EMBO J. (1987), 6, 3901-3907〕は、GUSの基質として1mMの4-メチルウンベリフェリル-β-D-グルクロニド（4-methylumbelliferyl-β-D-glucuronide: 4MUG）を細胞抽出液に加えた時に37℃におけるGUSの酵素反応により単位時間当たりに生成する蛍光色素4-メチルウンベリフェロン（4-methylumbellifrone: 4MU）の量で評価した。反応生成物4MUの定量は波長365nmの励起光による波長455nmの蛍光を測定することで行い、標準物質4MUを用いて作成した検量線からGUS活性（nmol 4MU/min/ml）を算出した。同一の実験条件における3つの独立した実験で得られたGUS比活性（GUS specific activity [nmol 4MU/min/mg protein]）の平均値を当該実験条件のGUS遺伝子発現活性とした。

この結果、多くの形質転換タバコ培養細胞クローンで、GUS遺伝子発現活性はVB-C<sub>6</sub>添加時（ON (VB+)）の方が無添加時（OFF (VB-)）より高く、VBによるGUS遺伝子の発現誘導を観察できた（図2）。barA遺伝子（実施例1, バイナリー・ベクターpBICaMV35S-barA）のタバ

コ培養細胞 B Y 2 への導入により得られた、Bar A蛋白質を比較的高蓄積していると思われる形質転換タバコ培養細胞クローン（実施例3、図1に示した30番及び21番）に、更に、BARE-3の支配下に置いたGUSレポーター遺伝子（実施例2、バイナリー・ベクターpBICaMV35S-UDD-gus）を5導入して得られた形質転換タバコ培養細胞クローンのいくつか（クローン30番由来の30-16番、30-17番、30-23番及び30-35番、及びクローン21番由来の21-5番、21-21番及び21-22番）では、VB-C<sub>6</sub>添加時（ON）の無添加時（OFF）に対するGUS遺伝子発現活性の比（GUS遺伝子発現活性（ON）／GUS遺伝子発現活性（OFF））、すなわち、VBによる遺伝子発現誘導活性（Induction rate）は最大で約30（Induction rate≤30）であった。bar A遺伝子（実施例1、バイナリー・ベクターpBICaMV35S-bar A）のタバコ培養細胞 B Y 2 への導入により得られた、Bar A蛋白質を少量しか蓄積していないと思われる形質転換タバコ培養細胞クローン（実施例3、図1に示した27番）に、更に、BARE-3の支配下に置いたGUSレポーター遺伝子（実施例2、バイナリー・ベクターpBICaMV35S-UDD-gus）を導入して得られた形質転換タバコ培養細胞クローンのいくつか（27-1番及び27-9番）では、VBによる遺伝子発現誘導活性は2未満（Induction rate<2）であった。このように、形質転換タバコ培養細胞内に蓄積するBar A蛋白質の量が多くなるに伴ってVBによる遺伝子発現誘導活性は大きくなった。

このように、放線菌自己調節因子VBをインデューサーとする遺伝子発現誘導系を構成するリプレッサーBar A（VBのレセプター蛋白質）及びオペレーターBARE-3（Bar Aのターゲット配列の1つ）の形質を遺伝子導入によりタバコ培養細胞に付与し、形質転換されたタバコ培養細胞に対しVBを投与することによって、BARE-3の支配下に置いた遺伝子の発現をVB投与部位において誘導することができた。

（実施例5）

放線菌ストレプトミセス・バージニアエの自己調節因子VBをインデューサーとする遺伝子発現誘導系を構成するリプレッサーBarA (VBのレセプター蛋白質) 及びオペレーターBARE-3 (BarAのターゲット配列の1つ) の形質を遺伝子導入によりタバコ培養細胞に付与した。すなわち、リプレッサーbarA遺伝子及びオペレーターBARE-3の支配下に置いたGUSレポーター遺伝子の2つの遺伝子を一過的な形質転換のためにタバコ培養細胞に導入した。

遺伝子導入には電気穿孔法を用いた。そのために、タバコ培養細胞をプロトプラスト化処理した。タバコ培養細胞BY2を、改変LS培地を用いた27°Cの暗所での振盪培養により、約1/50希釈—約1週間周期で継代し、対数増殖期 (10 継代後3~5日目) の細胞を酵素液 (0.1%ペクトリーゼY23 [(株) ヤクルト] , 1%セルラーゼ“オノズカ”RS [(キッコーマン (株))] , 0.4Mマンニトール, pH 5.5) に懸濁した。30°Cで2~3時間酵素反応を進行させ、途中の15分毎のピペットイングにより細胞を分散させた。球形の細胞がほぼ完全に分散していることを顕微鏡で確認し、この状態の細胞をプロトプラストとして遺伝子導入に用いた。プロトプラストを0.4Mマンニホールで洗浄後、電気穿孔用緩衝液 (5mM 2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸 (2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid: MES) , 70mM KCl, 0.3Mマンニトール) に $3 \times 10^6 / \text{ml}$ の細胞密度で懸濁した。barA遺伝子 (実施例1、プラスミドpNtADH-barA) 50 μg、BARE-3の支配下に置いたGUSレポーター遺伝子 (実施例2、プラスミドpCaMV35S UDD-gus及びpCaMV35S D-gus) 5 μg及び遺伝子導入をモニターするためのルシフェラーゼ (luciferase: LUC) 遺伝子 (プラスミドpCaMV35S-luc [Milla等, Plant Mol. Biol. Rep. (1992)、10、324-337]) 1 μgをプロトプラスト懸濁液 $500 \mu \text{l}$ と完全混合しジーン・パルサー [日本バイオ・ラッド・ラボラトリーズ (株)] のキュベット (電極間距離が4mm) に移した。電圧200V、静電容量250 μF及び抵抗400Ωに設定したパルスをキュベット電極間に発生させた。パルス発生時の時定数は15~20ミ

リ秒であった。パルスを負荷したキュベットからすばやくプロトプラストをシャーレ（直径6 cm）に移し、これに4. 5 mlの培地（改変L S 培地、10 g/1 ショ糖、0. 4Mマンニトール）を加えた。

このようにして得られた一過的形質転換タバコ培養細胞プロトプラストに対し  
5 インデューサーVBを投与することによって、オペレーターBARE-3の支配  
下に置いたGUSレポーター遺伝子の発現が誘導されるかどうかを調べた。

シャーレ内の一過的形質転換タバコ培養細胞プロトプラストの培養液にVBを  
添加（VB-C<sub>6</sub>最終濃度：1 μM）し、20時間25℃の暗所に静置したプロト  
プラストから調製した細胞抽出液のGUS遺伝子発現活性（LUC活性に対する  
10 GUS活性の比、すなわち、GUS/LUC値を用いて評価）をVB無添加のそ  
れと比較した。VBの添加は実施例4と同様に行った。シャーレから回収し、遠  
心分離により上澄みを除いたプロトプラストを500 μlの細胞抽出用緩衝液（  
0. 1M KPO<sub>4</sub>, 2 mM EDTA, 5%グリセロール, 2 mM DTT,  
pH 7. 8）に懸濁し、超音波発生装置〔（株）トミー精工 Handy Soni  
c UR-20P〕を用いて破碎した。細胞破碎液を高速遠心分離して得ら  
れた上澄みを細胞抽出液とした。細胞抽出液のGUS活性（nmol 4MU/  
min/m<sup>2</sup>）は実施例4と同様に測定した。細胞抽出液のLUC活性は、LUC  
の基質として470 μMのルシフェリン（luciferin）〔東洋インキ  
製造（株）ピッカジーン〕を含む100 μlの細胞抽出用緩衝液に20 μlの  
20 細胞抽出液を室温で混合し、直ぐにルミノメーター〔ベルトールド研究所（ドイ  
ツ）Lumat LB 9501〕を用いて測定した10秒間の発光量で評価し  
た。ルシフェラーゼ標品を用いて作成した検量線からLUC活性（pmol L  
UC/m<sup>2</sup>）を算出した。同時に調製したプロトプラストを用いた同一の実験条  
件における3つの独立した実験で得られたGUS/LUC値（nmol 4MU  
25 /min/pmol LUC）の平均値を当該実験条件におけるGUS遺伝子発  
現活性とした。

この結果、BARE-3の支配下に置いたGUSレポーター遺伝子としてプラ  
スミドpCaMV35S UDD-gus及びpCaMV35S D-gusのいず

れを一過的な形質転換に用いても、GUS遺伝子発現活性はVB-C<sub>6</sub>添加時（ON）の方が無添加時（OFF）より高く、VBによるGUS遺伝子の発現誘導を観察できた（図3）。VBによる遺伝子発現誘導活性（Induction rate=GUS遺伝子発現活性（ON）／GUS遺伝子発現活性（OFF））は、  
 5 各々 Induction rate=5（図3, barA+, 35SUDD），及び Induction rate=2（図3, barA+, 35SD）であった。このように、BARE-3の数が多くなるに伴ってVBによる遺伝子発現誘導活性は大きくなつた。これに対し、barA遺伝子を一過的な形質転換に用いなかつた（barA遺伝子を含有しない対照プラスミドpNTADHABを一過的な形質転換に用いた）場合（図3, barA-）、及びBARE-3の支配下にないGUSレポーター遺伝子（BARE-3を含有しない対照プラスミドpBI221）を一過的な形質転換に用いた場合（図3, 35S）は、いずれもVBによる遺伝子発現誘導活性は観察されなかつた（Induction rate=1）。

10 15 実施例3と同様のウェスタン・プロッティング法による解析の結果、得られた一過的形質転換タバコ培養細胞プロトプラストでリプレッサーBarA蛋白質の蓄積を確認した（図1, T）。

20 このように、放線菌自己調節因子VBをインデューサーとする遺伝子発現誘導系を構成するリプレッサーBarA（VBのレセプター蛋白質）及びオペレーター-BARE-3（BarAのターゲット配列の1つ）の形質を遺伝子導入によりタバコ培養細胞に付与し、一過的に形質転換されたタバコ培養細胞に対しVBを投与することによって、BARE-3の支配下に置いた遺伝子の発現をVB投与部位において誘導することができた。

25 (実施例6)

放線菌ストレプトミセス・バージニアエの自己調節因子VBをインデューサーとする遺伝子発現誘導系を構成するリプレッサーBarA（VBのレセプター蛋白質）及びオペレーター-BARE-3（BarAのターゲット配列の1つ）の形

質を遺伝子導入によりタバコ培養細胞に付与した。すなわち、リプレッサー b a r A 遺伝子をタバコ培養細胞に導入し、得られた形質転換タバコ培養細胞に、更に、オペレーター B A R E - 3 の支配下に置いた G U S レポーター遺伝子を一過的な形質転換のために導入した。

5 b a r A 遺伝子（実施例 1, バイナリー・ベクター p B I C a M V 3 5 S - b a r A）のタバコ培養細胞 B Y 2 への導入により得られた、B a r A 蛋白質を比較的高蓄積していると思われる形質転換タバコ培養細胞クローン（実施例 3、図 1 に示した 21 番）に、更に、B A R E - 3 の支配下に置いた G U S レポーター遺伝子（実施例 2, プラスミド p C a M V 3 5 S U D D - g u s, p C a M V 3 10 5 S D - g u s, p C a M V 3 5 S U - g u s 及び p C a M V 3 5 S U D - g u s）を一過的な形質転換のために導入した。B A R E - 3 の支配下に置いた G U S レポーター遺伝子の導入は実施例 5 と同様に行った。遺伝子導入効率をモニターするため、ルシフェラーゼ遺伝子（プラスミド p C a M V 3 5 S - 1 u c）も併せて一過的形質転換に用いた。

15 このようにして得られた一過的形質転換タバコ培養細胞プロトプラストに対しインデューサー V B を投与することによって、オペレーター B A R E - 3 の支配下に置いた G U S レポーター遺伝子の発現が誘導されるかどうかを調べた。

実施例 5 と同様に、シャーレ内の一過的形質転換タバコ培養細胞プロトプラストの培養液に V B を添加（V B - C<sub>6</sub> 最終濃度：1 μM）し、20 時間 25 °C の暗所に静置したプロトプラストから調製した細胞抽出液の G U S 遺伝子発現活性（L U C 活性に対する G U S 活性の比、すなわち、G U S / L U C 値を用いて評価）を V B 無添加のそれと比較した。

この結果、B A R E - 3 の支配下に置いた G U S レポーター遺伝子としてプラスミド p C a M V 3 5 S U D D - g u s, p C a M V 3 5 S D - g u s, p C a M V 3 5 S U - g u s 及び p C a M V 3 5 S U D - g u s のいずれを一過的な形質転換に用いても、G U S 遺伝子発現活性は V B - C<sub>6</sub> 添加時（ON）の方が無添加時（OFF）より高く、V B による G U S 遺伝子の発現誘導を観察できた（図 4）。V B による遺伝子発現誘導活性（Induction rate = G U S

遺伝子発現活性 (ON) / GUS 遺伝子発現活性 (OFF) は、各々 Induction rate = 22 (図 4, 35 SUDD), Induction rate = 4 (図 4, 35 SD), Induction rate = 2 (図 4, 35 SU), 及び Induction rate = 13 (図 4, 35 SUD) であった。<sup>5</sup> このように、BARE-3 の数が多くなるに伴って VB による遺伝子発現誘導活性は大きくなつた。BARE-3 の位置は TATA ボックスの 3' 下流近傍の方が 5' 上流近傍より VB による遺伝子発現誘導活性は大きかつた。これに對し、BARE-3 の支配下にない GUS レポーター遺伝子 (BARE-3 を含有しない対照プラスミド pBI221) を一過的な形質転換に用いた場合 (図 4, 10 35 S) は、VB による遺伝子発現誘導活性は観察されなかつた (Induction rate = 1)。<sup>10</sup>

このように、放線菌自己調節因子 VB をインデューサーとする遺伝子発現誘導系を構成するリプレッサー BarA (VB のレセプター蛋白質) 及びオペレーター BARE-3 (BarA のターゲット配列の 1 つ) の形質を遺伝子導入によりタバコ培養細胞に付与し、一過的に形質転換されたタバコ培養細胞に対し VB を投与することによって、BARE-3 の支配下に置いた遺伝子の発現を VB 投与部位において誘導することができた。<sup>15</sup>

#### (実施例 7)

放線菌ストレプトミセス・バージニアエの自己調節因子 VB をインデューサーとする遺伝子発現誘導系を構成するリプレッサー BarA (VB のレセプター蛋白質) 及びオペレーター BARE-3 (BarA のターゲット配列の 1 つ) の形質を遺伝子導入によりタバコ培養細胞に付与し、一過的に形質転換されたタバコ培養細胞に対し低濃度のインデューサー VB を投与することによって、オペレーター BARE-3 の支配下に置いた GUS レポーター遺伝子の発現が誘導されるかどうかを調べた。<sup>20</sup>

実施例 6 と同様に、barA 遺伝子 (実施例 1、バイナリー・ベクター pBI CAMV 35 S-barA) のタバコ培養細胞 BY 2 への導入により得られた、

B a r A蛋白質を比較的高蓄積していると思われる形質転換タバコ培養細胞クローン（実施例3、図1に示した21番）に、更に、B A R E - 3の支配下に置いたG U Sレポーター遺伝子（実施例2、プラスミドp C a M V 3 5 S D - g u s）を導入して得られた一過的形質転換タバコ培養細胞プロトプラストの培養液に5 V Bを添加（V B - C<sub>6</sub>最終濃度：1 μM、1 0 0 nM及び1 0 nM）し、20時間25℃の暗所に静置したプロトプラストから調製した細胞抽出液のG U S遺伝子発現活性（L U C活性に対するG U S活性の比、すなわち、G U S／L U C値を用いて評価）をV B無添加のそれと比較した。

この結果、B A R E - 3の支配下に置いたG U Sレポーター遺伝子としてプラスミドp C a M V 3 5 S D - g u sを一過的な形質転換に用いた場合、V B - C<sub>6</sub>の濃度が1 μM、1 0 0 nM及び1 0 nMのいずれにおいても、G U S遺伝子発現活性はV B - C<sub>6</sub>添加時（ON）の方が無添加時（OFF）より高く、V BによるG U S遺伝子の発現誘導を観察できた（図5）。V Bによる遺伝子発現誘導活性（Induction rate=G U S遺伝子発現活性（ON）／G U S遺伝子発現活性（OFF））は、各々Induction rate=5, Induction rate=4, 及びInduction rate=1. 4であった。このように、V Bによる遺伝子発現誘導活性はV Bの濃度の低下に伴って減少したが、1 0 0 nM以上のV B - C<sub>6</sub>濃度で十分に観察できた。

このように、放線菌自己調節因子V Bをインデューサーとする遺伝子発現誘導系を構成するリプレッサーB a r A（V Bのレセプター蛋白質）及びオペレーターB A R E - 3（B a r Aのターゲット配列の1つ）の形質を遺伝子導入によりタバコ培養細胞に付与し、一過的に形質転換されたタバコ培養細胞に対しV Bを1 0 0 nMという低濃度で投与することによって、B A R E - 3の支配下に置いた遺伝子の発現をV B投与部位において十分に誘導することができた。

25

（実施例8）

放線菌ストレプトミセス・バージニアエの自己調節因子V Bをインデューサーとする遺伝子発現誘導系を構成するリプレッサーB a r A（V Bのレセプター蛋白質）

白質) の形質を遺伝子導入によりタバコに付与した。すなわち、リプレッサー *b a r A* 遺伝子を形質転換のためにタバコに導入した。

遺伝子導入にはアグロバクテリウム感染法を用いた。*b a r A* 遺伝子の導入により一旦アグロバクテリウムを形質転換し、得られる形質転換アグロバクテリウムをタバコへ感染させた。

実施例 3 に用いたのと同じ形質転換アグロバクテリウムをリーフ・ディスク (leaf disc) 法によりタバコ (*Nicotiana tabacum* L.) へ感染させた。MS 培地 [Murashige 等, *Physiol. Plantarum* (1962), 15, 473-498] ゲランガム・ポットで育てた無菌タバコの葉数枚から 5~10 mm 角、あるいはディスク状の葉片を切り取りシャーレ内の無菌水に浸し、これに形質転換アグロバクテリウム培養液数 ml を混合した。葉片を取り出し、裏面を上にして MS カルス培地 (含 2 mg/1  $\alpha$ -ナフタレン酢酸 (naphthalene acetic acid), 0.2 mg/1 6-ベンジルアデニン (benzyladenine)) ゲランガム・プレートに並べた。人工気象器 (25°C, 明 16 時間・暗 8 時間) に 2 日静置したプレートから葉片を回収、無菌水で数回洗浄後、裏面を上にしてカナマイシン 100 mg/1 及びカルベニシリン 250 mg/1 を含む MS カルス培地ゲランガム・プレートに並べた。人工気象器に 1~2 週間静置したプレートからカナマイシン及びカルベニシリンを含む MS シュート培地 (含 0.02 mg/1  $\alpha$ -ナフタレン酢酸, 1 mg/1 6-ベンジルアデニン) ゲランガム・プレートに葉片を移し並べた。葉片の周囲にはカルス形成を確認した。葉片から芽 (シュート) が形成されるまでプレートを人工気象器に静置した。形成した芽 (シュート) を切り取り、カナマイシン及びカルベニシリンを含む MS 培地ゲランガム・ポットに植えた。人工気象器に静置したポットの中で根を生やした個体を形質転換タバコとしてハイグロマイシン 20 mg/1、カナマイシン 100 mg/1 及びカルベニシリン 250 mg/1 を含む MS 培地ゲランガム・ポットで選択、継代維持した。

## (実施例 9)

放線菌ストレプトミセス・バージニアエの自己調節因子 V B をインデューサーとする遺伝子発現誘導系を構成するリプレッサー B a r A (V B のレセプター蛋白質) 及びオペレーター B A R E - 3 (B a r A のターゲット配列の 1 つ) の形質を遺伝子導入によりタバコに付与した。すなわち、リプレッサー b a r A 遺伝子をタバコに導入し、得られた形質転換タバコに、更に、オペレーター B A R E - 3 の支配下に置いた G U S レポーター遺伝子を一過的な形質転換のために導入した。

b a r A 遺伝子 (実施例 1, バイナリー・ベクター p B I C a M V 3 5 S - b a r A ) のタバコ (N i c o t i a n a t a b a c u m L. ) への導入により得られた形質転換タバコ (実施例 8) に、更に、 B A R E - 3 の支配下に置いた G U S レポーター遺伝子 (実施例 2, プラスミド p C a M V 3 5 S D - g u s ) を一過的な形質転換のために導入した。

遺伝子導入には電気穿孔法を用いた。そのために、タバコをプロトプラスト化処理した。タバコの葉数枚から 5 ~ 10 mm 角の葉片を切り取り酵素液 (0. 1 % ペクトリーゼ Y 2 3 [ (株) ヤクルト] , 1 % セルラーゼ “オノズカ” R S [キッコーマン (株) ] , 0. 4 M マンニトール, pH 5. 5) に懸濁し、室温で数時間、酵素反応を進行させた。葉片表面に剥離層を観察した時点で酵素液を 70  $\mu$ m 孔のメッシュで濾し、濾液を遠心分離した。これにより沈降した緑色の細胞塊をプロトプラストとして遺伝子導入に用いた。プロトプラストを 0. 4 M マンニトールで洗浄後、電気穿孔用緩衝液 (5 mM MES, 70 mM KC1, 0. 3 M マンニトール) に  $6 \times 10^6 / \text{ml}$  の細胞密度で懸濁した。 B A R E - 3 の支配下に置いた G U S レポーター遺伝子 (実施例 2、プラスミド p C a M V 3 5 S D - g u s ) 10  $\mu$ g 及び遺伝子導入効率をモニターするためのルシフェラーゼ遺伝子 (p C a M V 3 5 S - 1 u c ) 1  $\mu$ g をプロトプラスト懸濁液 500  $\mu$ l と完全混合しジーン・パルサー [日本バイオ・ラッド・ラボラトリーズ (株) ] のキュベット (電極間距離が 4 mm) に移した。電圧 300 V、静電容量 250  $\mu$  F 及び抵抗 400  $\Omega$  に設定したパルスをキュベット電極間に発生させた。

パルス発生時の時定数は約16ミリ秒であった。パルスを負荷したキュベットからすばやくプロトプラストを等量ずつ2つのシャーレ（直径6cm）に移し、これらに各々4.75mlの培地（改変LS培地、10g／1ショ糖、0.4Mマニトール）を加えた。

5 このようにして得られた一過的形質転換タバコ・プロトプラストに対しインデューサーVBを投与することによって、オペレーターBARE-3の支配下に置いたGUSレポーター遺伝子の発現が誘導されるかどうかを調べた。

一方のシャーレ内の一過的形質転換タバコ・プロトプラストの培養液にVBを添加（VB-C<sub>6</sub>最終濃度：1μM）し、22時間25℃の暗所に静置したプロト

10 プラストから調製した細胞抽出液のGUS遺伝子発現活性（LUC活性に対するGUS活性の比、すなわち、GUS/LUC値を用いて評価）をもう一方のVB無添加のそれと比較した。VBの添加は、実施例4と同様に行った。シャーレから回収し、遠心分離により上澄みを除いたプロトプラストを500μlの細胞抽出用緩衝液（0.1M KPO<sub>4</sub>、2mM EDTA、5%グリセロール、2m

15 M DTT、pH7.8）に懸濁し、超音波発生装置〔（株）トミー精工 Handy Sonic UR-20P〕を用いて破碎した。細胞破碎液を高速遠心分離して得られた上澄みを細胞抽出液とした。細胞抽出液のGUS活性及びLUC活性は各々実施例4及び5と同様に測定した。同一の実験条件において2つの独立した実験を行った。

20 この結果、BARE-3の支配下に置いたGUSレポーター遺伝子としてプラスミドpCAMV35SD-gusを一過的な形質転換に用いた場合、GUS遺伝子発現活性はVB-C<sub>6</sub>添加時（ON）の方が無添加時（OFF）より高く、VBによるGUS遺伝子の発現誘導を観察できた。VBによる遺伝子発現誘導活性（Induction rate=GUS遺伝子発現活性（ON）/GUS遺伝子発現活性（OFF））はいずれもInduction rate=2であった。

25 このように、放線菌自己調節因子VBをインデューサーとする遺伝子発現誘導系を構成するリプレッサーBarA（VBのレセプター蛋白質）及びオペレーターBARE-3（BarAのターゲット配列の1つ）の形質を遺伝子導入により

タバコに付与し、一過的に形質転換されたタバコに対しVBを投与することによって、BARE-3の支配下に置いた遺伝子の発現をVB投与部位において誘導することができた。

5 (実施例10)

放線菌ストレプトミセス・バージニアエの自己調節因子VBをインデューサーとする遺伝子発現誘導系を構成するリプレッサーBarA (VBのレセプター蛋白質) 及びオペレーターBARE-3 (BarAのターゲット配列の1つ) の形質を遺伝子導入によりタバコに付与した。すなわち、リプレッサーbarA遺伝子及びオペレーターBARE-3の支配下に置いたGUSレポーター遺伝子の2つの遺伝子を形質転換のためにタバコに導入した。

barA遺伝子 (実施例1, バイナリー・ベクターpBICaMV35S-ba  
rA) をタバコ (*Nicotiana tabacum* L.) に導入し、得られた形質転換タバコ (実施例8) に、更に、BARE-3の支配下に置いたGUSレポーター遺伝子 (実施例2, バイナリー・ベクターpBICaMV35S  
UDD-gus) を導入した。遺伝子導入には実施例8と同様にアグロバクテリウム感染法を用いた。形質転換タバコは、ハイグロマイシン20mg/1、カナマイシン100mg/1及びカルベニシリン250mg/1を含むMS培地で選択、継代維持した。

20 このようにして得られた形質転換タバコに対しインデューサーVBを投与することによって、オペレーターBARE-3の支配下に置いたGUSレポーター遺伝子の発現が誘導されるかどうかを調べた。

形質転換タバコのわき芽をVB添加 (VB-C<sub>6</sub>最終濃度: 1 μM) のMS培地ポットに植え継ぎ、約3週間人工気象器で成長させた形質転換タバコの葉のGUS遺伝子発現活性 (GUS活性染色で観察される染色度合いで評価) をVB無添加のそれと比較した。GUS活性染色ではGUSの基質として1mMの5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-グルクロニド・シクロヘキシリアンモニウム (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-

glucuronide cyclohexylammonium salt : X-gluc) を含む細胞抽出用緩衝液 (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM EDTA, 10 mM 2-メルカプト・エタノール, pH 7) に切り取った葉を浸し 37°C 一晩反応させた。GUS の酵素反応による葉の青色色素生成を観察した。

この結果、形質転換タバコの GUS 遺伝子発現活性は VB-C<sub>6</sub> 添加時 (ON (VB+)) の方が無添加時 (OFF (VB-)) より高く、VB による GUS 遺伝子の発現誘導を観察できた (図 6)。

このように、放線菌自己調節因子 VB をインデューサーとする遺伝子発現誘導系を構成するリプレッサー Bar A (VB のレセプター蛋白質) 及びオペレーター BARE-3 (Bar A のターゲット配列の 1 つ) の形質を遺伝子導入によりタバコに付与し、形質転換されたタバコに対し VB を投与することによって、BARE-3 の支配下に置いた遺伝子の発現を VB 投与部位において誘導することができた。

15

#### 産業上の利用の可能性

本発明が提供する、放線菌の自己調節因子をインデューサーとする遺伝子発現誘導系を構成するリプレッサー及びオペレーターの形質を遺伝子導入により植物に付与し、形質転換された植物に対し放線菌自己調節因子を投与することによって、オペレーターの支配下に置いた遺伝子の発現を放線菌自己調節因子投与部位において誘導する方法は、所望する遺伝子を所望する時期及び部位に発現させることができ、植物の生育にとって不利となるような代謝産物も植物で生産可能にする。穀性のコントロールを介して形質転換植物の環境への拡散を防止する上でも有用である。本法は、植物における既知の遺伝子発現誘導方法に比較して低濃度で遺伝子発現誘導活性を示す優れた特性を持つインデューサーの使用を可能にすると同時に、使用するインデューサーの選択肢の拡大に道を開いた。

## 請求の範囲

1. 植物における遺伝子発現の誘導方法であって、放線菌の自己調節因子をインデューサーとする遺伝子発現誘導系を構成するリプレッサー及びオペレーターの形質を遺伝子導入により植物に付与し、形質転換された植物に対し放線菌自己調節因子を投与することによって、オペレーターの支配下に置いた遺伝子の発現を放線菌自己調節因子投与部位において誘導する方法。  
5
2. 前記放線菌が、ストレプトミセス (*S t r e p t o m y c e s*) 属である請求の範囲第1項に記載の方法。  
10
3. 前記放線菌が、ストレプトミセス・バージニアエ (*S t r e p t o m y c e s v i r g i n i a e*) である請求の範囲第1項に記載の方法。  
15
4. 前記自己調節因子が、ブチロラクトン (*b u t y r o l a c t o n e*) 型自己調節因子である請求の範囲第1から3項のいずれかに記載の方法。  
20
5. 前記自己調節因子が、バージニアエ・ブタノライド (*v i r g i n i a e b u t a n o l i d e*) である請求の範囲第1から3項のいずれかに記載の方  
法。  
25
6. 前記遺伝子発現誘導系が、抗生物質生産に関連するものである請求の範囲第1から5項のいずれかに記載の方法。  
7. 前記遺伝子発現誘導系が、バージニアマイシン (*v i r g i n i a m y c i n*) 生産に関連するものである請求の範囲第1から5項のいずれかに記載の方  
法。

8. 前記リプレッサーの遺伝子が、*b a r A*遺伝子である請求の範囲第1から7項のいずれかに記載の方法。

9. 前記リプレッサーの遺伝子が、配列番号1で示される塩基配列から成る領域を含有することを特徴とする請求の範囲第1から8項のいずれかに記載の方法。

10. 前記リプレッサーの遺伝子が、配列番号2で示されるアミノ酸配列をコードする領域を含有することを特徴とする請求の範囲第1から9項のいずれかに記載の方法。

10

11. 前記リプレッサーの遺伝子のプロモーターが、植物プロモーターである請求の範囲第1から10項のいずれかに記載の方法。

12. 前記植物プロモーターが、カリフラワー・モザイク・ウィルス (C a u l i f l o w e r   m o s a i c   v i r u s) 35Sプロモーターである請求の範囲第11項に記載の方法。

13. 前記オペレーターの塩基配列が、*b a r A*、*b a r B*又は*b a r X*のいずれかの遺伝子由来のものである請求の範囲第1から12項のいずれかに記載の方法。

14. 前記オペレーターの塩基配列が、B A R E - 1、B A R E - 2又はB A R E - 3のいずれかである請求の範囲第1から12項のいずれかに記載の方法。

25 15. 前記オペレーターの塩基配列が、B A R E - 3である請求の範囲第1から12項のいずれかに記載の方法。

16. 前記オペレーターの塩基配列が、配列番号3で示される塩基配列から成

る領域を含有することを特徴とする請求の範囲第1から15項のいずれかに記載の方法。

17. 前記オペレーターの支配下に置いた遺伝子のプロモーターが、植物プロ  
5 モーターである請求の範囲第1から16項のいずれかに記載の方法。

18. 前記植物プロモーターが、カリフラワー・モザイク・ウィルス (Ca u  
10 l i f l o w e r m o s a i c v i r u s) 35Sプロモーターである請求  
の範囲第17項に記載の方法。

19. 前記オペレーターが、前記植物プロモーターに1個以上配置されている  
請求の範囲第17又は18項に記載の方法。

20. 前記オペレーターが、前記植物プロモーターのTATAボックスの3'  
15 下流近傍又は5' 上流近傍に1個以上配置されている請求の範囲第17又は18  
項に記載の方法。

21. 前記オペレーターが、前記植物プロモーターのTATAボックスとともに、  
20 配列番号4から7のいずれかで示されるように配置されている請求の範囲第  
17から20項のいずれかに記載の方法。

22. 前記オペレーターの支配下に置いた遺伝子が、植物に稔性形質を付与す  
る遺伝子である請求の範囲第1から21項のいずれかに記載の方法。

23. 請求の範囲第1から22項のいずれかに記載の方法により形質転換され  
25 た植物。

24. 請求の範囲第1から22項のいずれかに記載の方法により形質転換され

たタバコ (*Nicotiana tabacum* L.)。

25. 請求の範囲第1から22項のいずれかに記載の方法により形質転換された植物培養細胞。

5

26. 請求の範囲第1から22項のいずれかに記載の方法により形質転換されたタバコ培養細胞。

27. 請求の範囲第1から22項のいずれかに記載の方法により形質転換されたタバコ培養細胞 BY 2。

28. 放線菌の自己調節因子をインデューサーとする遺伝子発現誘導系を構成するリプレッサーの遺伝子であって、そのプロモーターが植物プロモーターであることを特徴とするリプレッサー遺伝子。

15

29. 前記植物プロモーターが、カリフラワー・モザイク・ウィルス (*Cauliflower mosaic virus*) 35Sプロモーターである請求の範囲第28項に記載のリプレッサー遺伝子。

20 30. 前記リプレッサーの遺伝子が、bar A遺伝子である請求の範囲第28又は29項に記載のリプレッサー遺伝子。

31. 前記リプレッサーの遺伝子が、配列番号1で示される塩基配列から成る領域を含有することを特徴とする請求の範囲第28から30項のいずれかに記載のリプレッサー遺伝子。

32. 前記リプレッサーの遺伝子が、配列番号2で示されるアミノ酸配列をコードする領域を含有することを特徴とする請求の範囲第28から31項のいずれ

かに記載のリプレッサー遺伝子。

33. 放線菌の自己調節因子をインデューサーとする遺伝子発現誘導系を構成するオペレーターが、植物プロモーターのTATAボックスの3'下流近傍又は5'上流近傍に1個以上配置されていることを特徴とする改変プロモーター。

34. 前記植物プロモーターが、カリフラワー・モザイク・ウィルス (Cauliflower mosaic virus) 35Sプロモーターである請求の範囲第33項に記載の改変プロモーター。

10

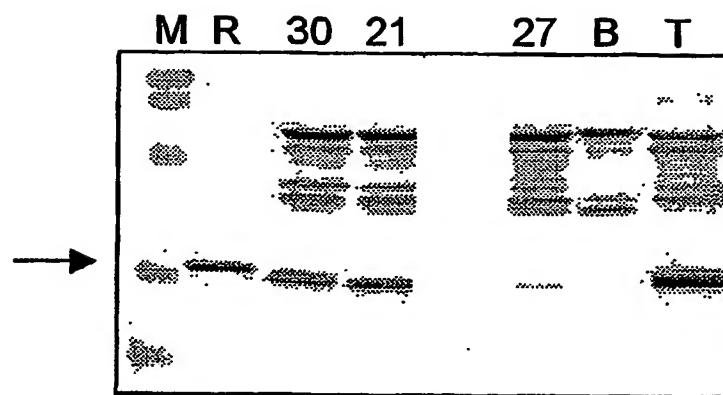
35. 前記オペレーターの塩基配列が、BARE-1、BARE-2又はBARE-3のいずれかである請求の範囲第33又は34項に記載の改変プロモーター。

15 36. 前記オペレーターの塩基配列が、配列番号3で示される塩基配列から成る領域を含有することを特徴とする請求の範囲第33から35項のいずれかに記載の改変プロモーター。

37. 前記オペレーターが、前記植物プロモーターのTATAボックスとともに、配列番号4から7のいずれかで示されるように配置されていることを特徴とする請求の範囲第33から36項のいずれかに記載の改変プロモーター。

1 / 4

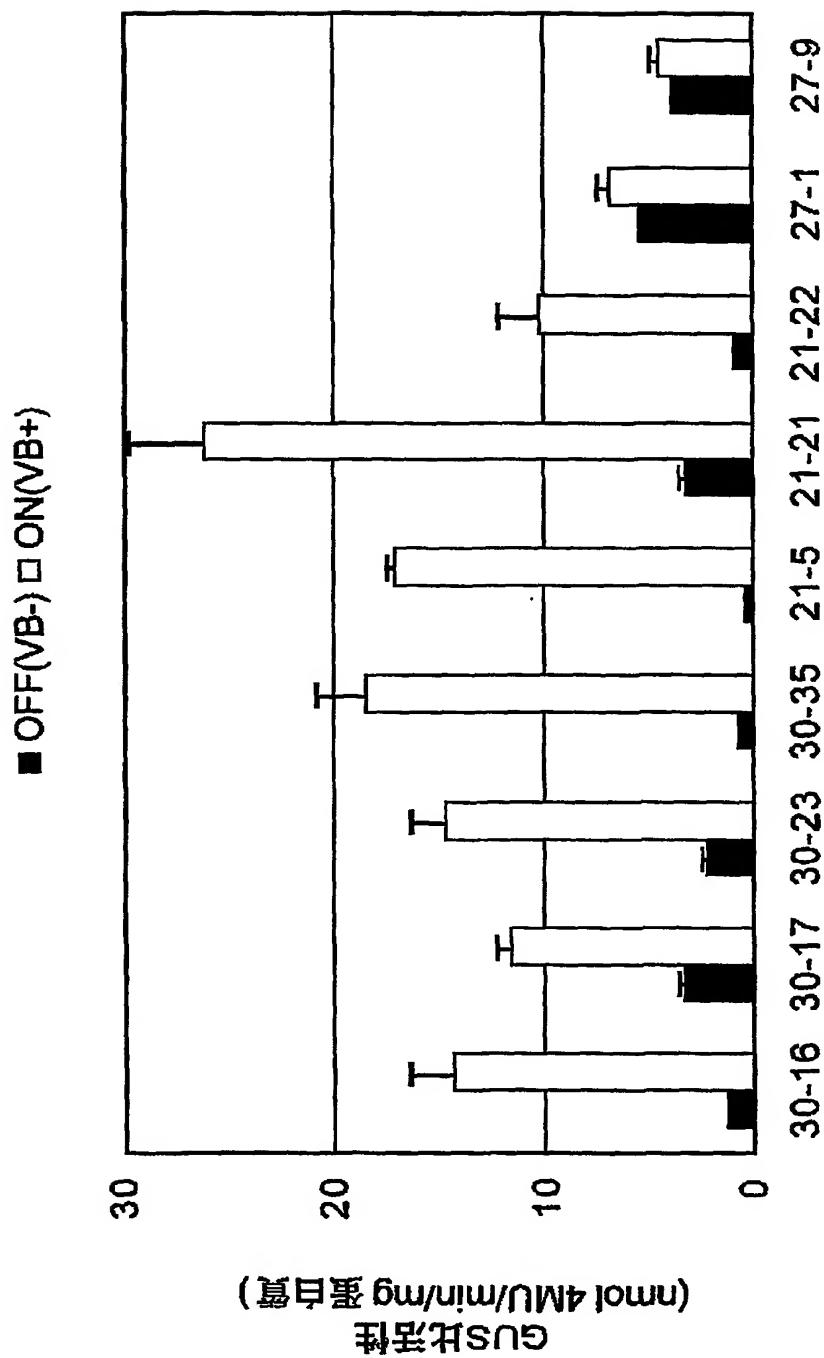
図 1





2 / 4

図 2





3 / 4

図 3

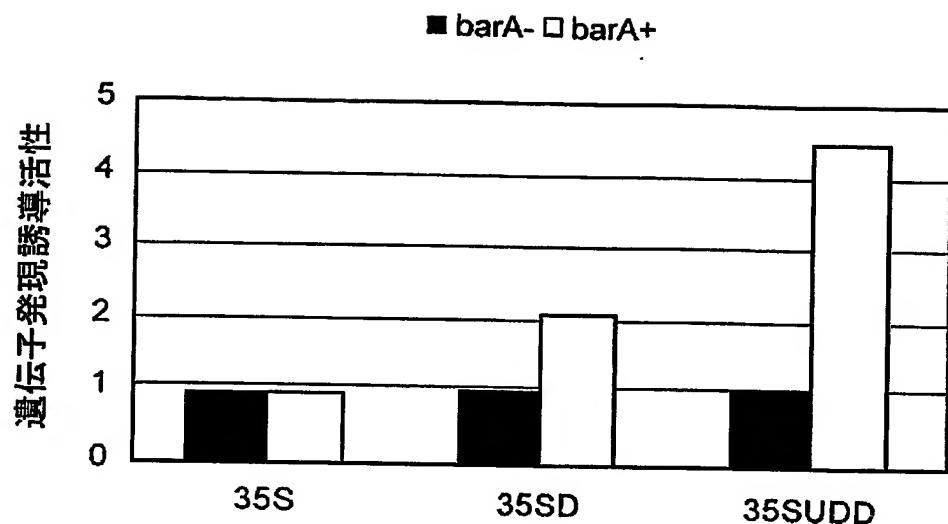
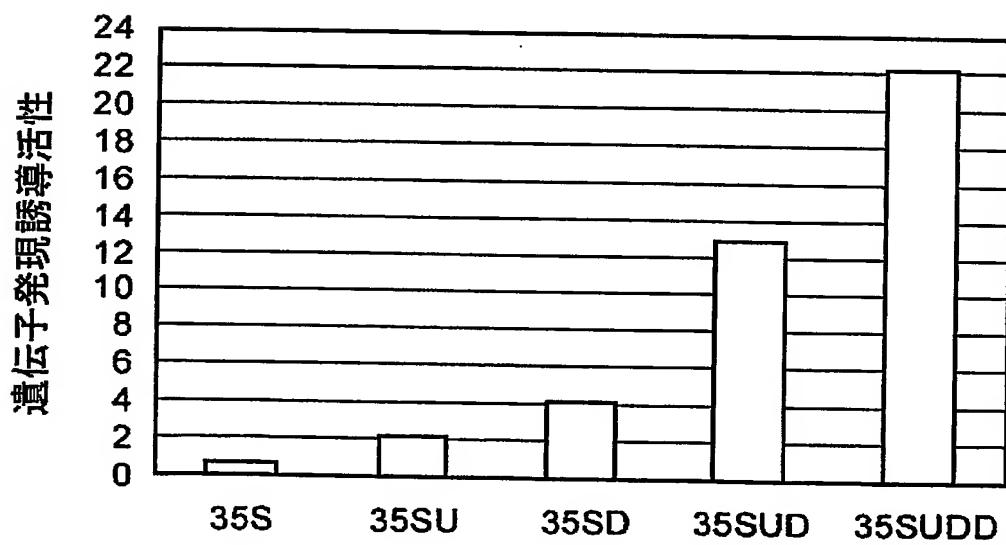


図 4





4 / 4

図 5

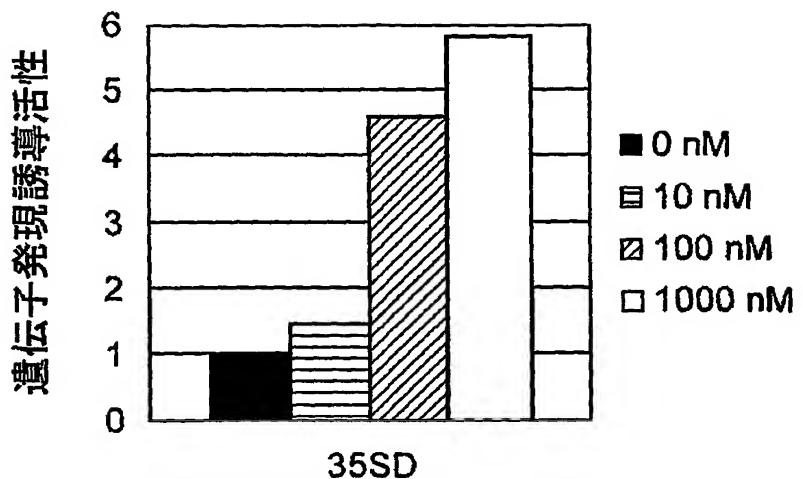
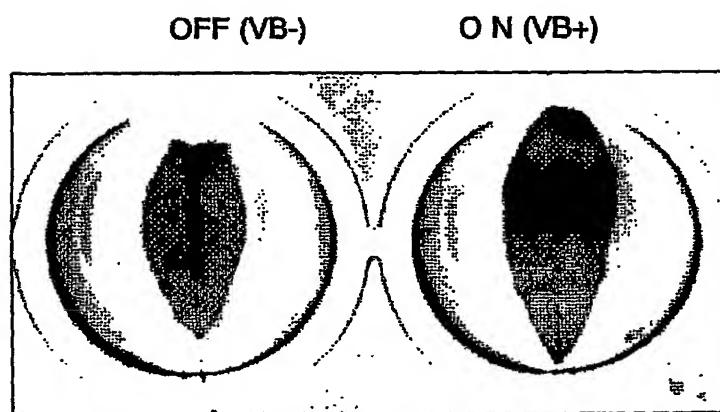


図 6





## Sequence Listing

<110> 鎌淵化学工業株式会社 Kaneka Corporation

<120> 植物における遺伝子発現の誘導方法及びその植物

Method for induction of gene expression in plants and plants thereof

<130> T619. PBT-2

<150> JP2000-180466

<151> 2000-06-15

<160> 11

<210> 1

<211> 699

<212> DNA

<213> Streptomyces virginiae

<220>

<221> CDS

<222> (1) ...(699)

<300>

<301> Okamoto, S., Nakamura, K., Nihira, T. and Yamada, Y.

<302> Virginiae butanolide binding protein from Streptomyces virginiae. Evidence that VbrA is not the virginiae butanolide binding protein and reidentification of the true binding protein

<303> The Journal of Biological Chemistry

<304> 270

<305> 20

<306> 12319-12326

<307> 1995-05-19

<308> D32251

<309> 1994-07-19

<400> 1

atg gca gtg cga cac gaa cgg gtg gca gtg cga cag gaa cgg gcc gtc 48



2 / 8

Met Ala Val Arg His Glu Arg Val Ala Val Arg Gln Glu Arg Ala Val  
1 5 10 15

cgc acg cgg cag gcg atc gtg cg<sup>g</sup> gca gcc gcc tcg gtc ttc gac gag 96  
Arg Thr Arg Gln Ala Ile Val Arg Ala Ala Ser Val Phe Asp Glu  
20 25 30

tac ggg ttc gag gcc gca aca gtg gca gag atc ctc tcg cgg gcc tcg 144  
Tyr Gly Phe Glu Ala Ala Thr Val Ala Glu Ile Leu Ser Arg Ala Ser  
35 40 45

gtc acc aag ggc gcg atg tac ttc cac ttc gct tcc aag gaa gag ctg 192  
Val Thr Lys Gly Ala Met Tyr Phe His Phe Ala Ser Lys Glu Glu Leu  
50 55 60

gcc cgc ggc gtg ctg gcc gag cag acc ctg cac gtg gcg gtg ccg gaa 240  
Ala Arg Gly Val Leu Ala Glu Gln Thr Leu His Val Ala Val Pro Glu  
65 70 75 80

tcc ggc tcc aag gcg cag gaa ctg gta gac ctc acc atg ctg gtc gcc 288  
Ser Gly Ser Lys Ala Gln Glu Leu Val Asp Leu Thr Met Leu Val Ala  
85 90 95

cac ggc atg ctg cac gat ccg atc ctg cgg gcg ggc acg ccg ctc gca 336  
His Gly Met Leu His Asp Pro Ile Leu Arg Ala Gly Thr Arg Leu Ala  
100 105 110

ctg gac cag ggg gcg gtg gac ttc tcc gac gcc aac ccg ttc ggc gag 384  
Leu Asp Gln Gly Ala Val Asp Phe Ser Asp Ala Asn Pro Phe Gly Glu  
115 120 125

tgg ggc gac atc tgc gcc cag ctc ctg gcg gag gca cag gaa ccg ggg 432  
Trp Gly Asp Ile Cys Ala Gln Leu Leu Ala Glu Ala Gln Glu Arg Gly  
130 135 140

gag gtg ctt ccg cac gtg aac ccg aaa aag acc ggc gac ttc atc gtc 480  
Glu Val Leu Pro His Val Asn Pro Lys Lys Thr Gly Asp Phe Ile Val  
145 150 155 160



ggc tgc ttc acc ggg ctc cag gcg gtc tcc cgg gtc acc tcc gac cgc 528  
Gly Cys Phe Thr Gly Leu Gln Ala Val Ser Arg Val Thr Ser Asp Arg

165 170 175

cag gac ctc ggc cac cgg atc tcg gtg atg tgg aac cac gtg ctg ccc 576  
Gln Asp Leu Gly His Arg Ile Ser Val Met Trp Asn His Val Leu Pro

180 185 190

agc atc gtg ccg gcg tcc atg ctg acc tgg atc gaa acc ggc gag gag 624  
Ser Ile Val Pro Ala Ser Met Leu Thr Trp Ile Glu Thr Gly Glu Glu

195 200 205

cgg atc ggg aag gtc gcg gcg gcc gag gcc gag gct gcg gag 672  
Arg Ile Gly Lys Val Ala Ala Ala Glu Ala Ala Glu Ala Ala Glu

210 215 220

gcc tcc gag gcc tcc gac gag tag 699  
Ala Ser Glu Ala Ala Ser Asp Glu

225 230 235

<210> 2

<211> 232

<212> PRT

<213> Streptomyces virginiae

<400> 2

Met Ala Val Arg His Glu Arg Val Ala Val Arg Gln Glu Arg Ala Val

1 5 10 15

Arg Thr Arg Gln Ala Ile Val Arg Ala Ala Ser Val Phe Asp Glu

20 25 30

Tyr Gly Phe Glu Ala Ala Thr Val Ala Glu Ile Leu Ser Arg Ala Ser

35 40 45

Val Thr Lys Gly Ala Met Tyr Phe His Phe Ala Ser Lys Glu Glu Leu

50 55 60



Ala Arg Gly Val Leu Ala Glu Gln Thr Leu His Val Ala Val Pro Glu  
 65                    70                    75                    80

Ser Gly Ser Lys Ala Gln Glu Leu Val Asp Leu Thr Met Leu Val Ala  
 85                    90                    95

His Gly Met Leu His Asp Pro Ile Leu Arg Ala Gly Thr Arg Leu Ala  
 100                    105                    110

Leu Asp Gln Gly Ala Val Asp Phe Ser Asp Ala Asn Pro Phe Gly Glu  
 115                    120                    125

Trp Gly Asp Ile Cys Ala Gln Leu Leu Ala Glu Ala Gln Glu Arg Gly  
 130                    135                    140

Glu Val Leu Pro His Val Asn Pro Lys Lys Thr Gly Asp Phe Ile Val  
 145                    150                    155                    160

Gly Cys Phe Thr Gly Leu Gln Ala Val Ser Arg Val Thr Ser Asp Arg  
 165                    170                    175

Gln Asp Leu Gly His Arg Ile Ser Val Met Trp Asn His Val Leu Pro  
 180                    185                    190

Ser Ile Val Pro Ala Ser Met Leu Thr Trp Ile Glu Thr Gly Glu Glu  
 195                    200                    205

Arg Ile Gly Lys Val Ala Ala Ala Ala Glu Ala Ala Glu Ala Ala Glu  
 210                    215                    220

Ala Ser Glu Ala Ala Ser Asp Glu  
 225                    230                    235

<210> 3

<211> 26

<212> DNA

<213> Streptomyces virginiae



&lt;300&gt;

&lt;301&gt; Kinoshita, H., Tsuji, T., Ipposhi, H., Nihira, T. and Yamada, Y.

&lt;302&gt; Characterization of Binding Sequences for Butyrolactone Autoregulator Receptors in Streptomycetes

&lt;303&gt; Journal of Bacteriology

&lt;304&gt; 181

&lt;305&gt; 16

&lt;306&gt; 5075-5080

&lt;307&gt; 1999-08

&lt;308&gt; D32251

&lt;309&gt; 1994-07-19

&lt;400&gt; 3

agatacatac caaccgggttc ttttga 26

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 110

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Designed sequence of the CaMV 35S promoter modified to contain the operator BARE-3 element just downstream of its TATA-box

&lt;400&gt; 4

gatatctcca ctgacgtaag ggatgacgca caatcccaact atccttcgca agacccttcc 60

tctatataag agatacatac caaccgggttc ttttgcggg ggactctaga 110

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 110

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Designed sequence of the CaMV 35S promoter modified to contain the operator BARE-3 element just upstream of its TATA-box



&lt;400&gt; 5

gatatctcca ctgacgtaag ggatgacgca caatcagata cataccaacc gttttttt 60

actatataag gaagttcatt tcattttggag agaacacggg ggactctaga 110

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 110

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Designed sequence of the CaMV 35S promoter modified to contain the operator BARE-3 elements just downstream and upstream of its TATA-box

&lt;400&gt; 6

gatatctcca ctgacgtaag ggatgacgca caatcagata cataccaacc gttttttt 60

actatataag agatacatac caaccgggtt ttttacggg ggactctaga 110

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 136

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Designed sequence of the CaMV 35S promoter modified to contain three of the operator BARE-3 elements just downstream and upstream of its TATA-box

&lt;400&gt; 7

gatatctcca ctgacgtaag ggatgacgca caatcagata cataccaacc gttttttt 60

actatataag agatacatac caaccgggtt ttttgaagat acataccaac cggtttttt 120

gacgggggac tctaga 136

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 27



<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed sequence of a backward primer containing the restriction enzyme BamH I recognition sequence for PCR amplification of the barA gene coding region to be cloned by cut with the enzyme

<400> 8

tagatccat aaatggcagt gcgacac 27

<210> 9

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed sequence of a forward primer containing the restriction enzyme Sac I recognition sequence for PCR amplification of the barA gene coding region to be cloned by cut with the enzyme

<400> 9

tagagctcct actcgtcgga ggccggcc 27

<210> 10

<211> 67

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed sequence of one of paired oligo DNAs for construction of the modified CaMV 35S promoter containing three of the operator BARE-3 elements just downstream and upstream of its TATA-box

<400> 10

cggatatctc cactgacgta agggatgacg cacaatcaga tacataccaa ccggttcttt 60

tgactat 67



<210> 11

<211> 89

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed sequence of the other of paired oligo DNAs for construction of the modified CaMV 35S promoter containing three of the operator BARE-3 elements just downstream and upstream of its TATA-box

<400> 11

gctctagagt ccccgtaaa aagaaccggt tggtatgtat cttaaaaaga accggttggt 60

atgtatctct tatatagtca aaagaaccg 89



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application N .

PCT/JP01/05096

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N 15/82, A01H 5/00, C12N 5/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N 15/82, A01H 5/00, C12N 5/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), JICST FILE (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 494724 A2 (Inst. Genbiologische Forschung), 15 July, 1992 (15.07.92), & DE 4100594 A & AU 9210105 A & CA 2058900 A & HU 65428 T & JP 6-339384 A	1-37
A	KINOSHITA, H. et al., "Butyrolactone autoregulator receptor protein (BarA) as a transcriptional regulator in Streptomyces virginiae", J. Bacteriol., Vol.179, No.22, pages 6986 to 6993	1-37
A	KINOSHITA, H. et al., "Characterization of binding sequences for butyrolactone autoregulator receptors in streptomycetes", J. Bacteriol., Vol.181, No.16, pages 5075 to 5070	1-37

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

- \* Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
30 August, 2001 (30.08.01)Date of mailing of the international search report  
11 September, 2001 (11.09.01)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/05096

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KITANI, S. et al., "In vitro analysis of the butyrolactone autoregulator receptor protein (FarA) of <i>Streptomyces lavendulae</i> FRI-5 reveals that FarA acts as a DNA-binding transcriptional regulator that controls its own synthesis", <i>J. Bacteriol.</i> , Vol.181, No.16, pages 5081 to 5084	1-37

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12N 15/82, A01H 5/00, C12N 5/10

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12N 15/82, A01H 5/00, C12N 5/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG), JICSTファイル(JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	EP 494724 A2 (INST. GENBIOLOGISCHE FORSCHUNG) 15. 7月. 1992 (15. 07. 92) & DE 4100594 A & AU 9210105 A & CA 2058900 A & HU 65428 T & JP 6-339384 A	1-37
A	KINOSHITA, H. et al. Butyrolactone autoregulator receptor protein(BarA) as a transcriptional regulator in Streptomyces virginiae. J. Bacteriol., Vol. 179, No. 22, p. 6986-6993	1-37

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 30. 08. 01	国際調査報告の発送日 11.09.01
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 高堀 栄二 電話番号 03-3581-1101 内線 3448 4B 9281 

## C (続き) 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	KINOSHITA, H. et al. Characterization of binding sequences for butyrolactone autoregulator receptors in streptomycetes. J. Bacteriol., Vol. 181, No. 16, p. 5075-5070	1-37
A	KITANI, S. et al. In vitro analysis of the butyrolactone autor regulator receptor protein (FarA) of Streptomyces lavendulae FRI-5 reveals that FarA acts as a DNA-binding transcriptional regulator that controls its own synthesis. J. Bacteriol., Vol. 181, No. 16, p. 5081-5084	1-37